



**Facultad de Veterinaria**  
**Universidad Zaragoza**

# **Agentes terapéuticos anticancerígenos.**

Máster Universitario en iniciación a la  
Investigación en ciencias Veterinarias.

Ignacio González del Rosal

Curso 2012/2013.

**M<sup>a</sup> JESUS RODRIGUEZ YOLDI**, Profesora titular de la Universidad de Zaragoza

y

**MARIANO LAGUNA CASTRILLO**, Profesor de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, (CSIC), con destino en el Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH), de la Universidad de Zaragoza.

**CERTIFICAN:**

Que la presente memoria titulada: **Agentes Terapéuticos Anticancerígenos** ha sido realizada en el departamento de Farmacología y Fisiología. Unidad de Fisiología, en la Facultad de Veterinaria, de la Universidad de Zaragoza, bajo nuestra supervisión:

Zaragoza, 29 Noviembre 2013.

## **INDICE:**

---

1. Abstrac
2. Introducción
3. Parte experimental
  - 3.1-Estudios farmacodinámicos: cálculo de  $IC_{50}$ .
  - 3.2. Estudios toxicológicos: Apoptosis y ciclo celular.
4. Discusión de resultados
5. Conclusiones
6. Bibliografía
7. Anexos

# **ABSTRAC**

## **1- ABSTRAC**

---

Therapeutic anticancer agents.

The aim of this work is to investigate the antitumoral efficiency of Gold (III) complex and squalene on caco-2 cells.

To study cytotoxicity two different substances were used: squalene, a natural compound present in olive oil, and a Gold (III) organometallic complex with donor Nitrogen laboratory-made.

For cell treatment study caco-2 cells were seeded in 96 well plate. The culture medium was replaced with fresh medium containing Au (III) complex and squalene at concentrations varying from 0 to 20 microM, with 72 hours exposure time.

Cell survival was measured using the MTT test. Dead cells were studied with flow cytometry to evaluate apoptosis and cell cycle.

### **Resumen:**

Agentes terapéuticos anticancerígenos.

El objetivo de este trabajo es estudiar la eficacia antitumoral de complejos de oro(III) y de escualeno en células Caco-2.

Se han utilizado para estudiar la citotoxicidad dos sustancias diferentes: el escualeno, un compuesto natural presente en el aceite de oliva, y un complejo organometálico de oro (III) con ligandos nitrógeno dadores sintetizado en laboratorio.

Para el estudio del tratamiento de células Caco-2, estas fueron sembradas en placas de 96 pocillos. El medio de cultivo fue reemplazado con medio fresco que contiene Au (III) y escualeno a concentraciones variables, de 0 a 20 microM, con 72 horas de tiempo de exposición.

La supervivencia celular o viabilidad se midió mediante la prueba de MTT. Los ensayos de toxicidad se realizaron por citometría de flujo para evaluar supervivencia, muerte, apoptosis y el ciclo celular.

# INTRODUCCIÓN

## 2- INTRODUCCIÓN:

---

Se considera que fue en Egipto donde tuvo sus orígenes la química y solo los sacerdotes tenían acceso a estos conocimientos, ya que se consideraban prácticas sagradas. Estos conocimientos llegaron a Europa a través de Bizancio y a España después de ser conquistada por los árabes en el año 711, es aquí donde la palabra “química” se transforma en “alquimia” añadiendo el prefijo “al” característico de la lengua árabe. Los alquimistas desarrollaron en gran medida los conocimientos químicos. Y son los últimos alquimistas, los que obtienen en gran cantidad de preparados químicos destinados a fines curativos.

La química en esta época se convierte en una disciplina auxiliar de la medicina, y las boticas se convierten en centros dinámicos de experimentación, donde se manifiesta la búsqueda intangible de nuevos preparados químicos útiles para ser empleados como medicamentos.

Si hablamos del uso del oro en la medicina vemos que es en el antiguo imperio chino, donde ya se buscaba un elixir como panacea para múltiples enfermedades, incluso para alcanzar la inmortalidad, aunque con anterioridad ya se había descrito su uso cuando Plinio de Grecia, (siglo I) prescribe oro para curar las verrugas. En Europa el uso del oro se popularizó con los alquimistas. En el siglo XIII, se utilizó para el tratamiento de la lepra, en el siglo XVI para el tratamiento de la epilepsia y en los siglos XVII y XVIII para trastornos psicológicos, y posteriormente ya en el siglo XIX para tratar sífilis y alcoholismo.

Pero no fue hasta 1890, cuando comienza la investigación científica en torno al oro, cuando Robert Koch descubre por casualidad la propiedad antimicrobiana del complejo  $K [Au(CN)_2]$ . Este derivado de oro (I) resultó tóxico para el bacilo de la tuberculosis Tbc.

A partir de aquí, muchos ensayos y grandes descubrimientos se han realizado gracias a este metal noble. Por ejemplo en 1924, con la crisoterapia se empleaban las sales de oro<sup>1</sup> para el tratamiento de Möllgaard (que es el antiguo tratamiento para la Tbc.). En este tratamiento se estudiaba la sanocrisina, *in vitro*, frente al bacilo por Möllgaard. La sanocrisina contiene un 37,4% de oro y era más cara que cualquiera de los antibióticos actuales; La Sanocrisina se podía sintetizar por la reacción de  $Na[AuCl_2]$  con tiosulfato de sodio, como se muestra en la Figura 1.

---

<sup>1</sup> Diccionario terminológico de ciencias medicas, 12ª edición, Salvat, 279(1990)

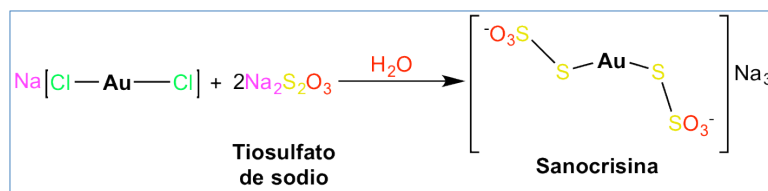


Figura 1. Síntesis de Sanocrisina.

A partir de 1931 se generalizó el tratamiento para la artritis reumatoide con Au, ya que se pensaba que esta enfermedad tenía un origen bacteriano. También se utilizó este elemento en aplicaciones medicas como marcapasos, “stents”, implantes de oído y odontología<sup>2,3</sup>.



Figura 2. Sales de Oro

La bioquímica es la ciencia que estudia la química de la vida, es un puente entre la cuyo objeto de estudio son la estructura y las transformaciones de los componentes de las células, como las proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleídos y otras biomoléculas. La bioquímica también está involucrada, en el metabolismo celular, en el estudio del código genético (ADN, ARN), en la síntesis de proteínas, el mecanismo de transporte de la membrana celular y la transducción de señales, que es la transformación de un tipo de señal o energía en otra de distinta naturaleza.

En nuestro caso nos vamos a centrar en la química bioinorgánica, que es un área interdisciplinaria que se ocupa del papel de los metales en los sistemas biológicos. La química de la vida (o bioquímica) no es sólo una prerrogativa de la química orgánica, esto último, a pesar de la inmensidad, de hecho se basa principalmente en sólo seis elementos: C, H, N, O, P y S: "los seis grandes". En realidad, la química de la vida consiste en 25 elementos, que se denominan elementos esenciales y la mayoría de ellos son metales. Sin estos elementos la vida tal como la conocemos no podría existir.

La química bioinorgánica se encarga de: aclarar el papel de los elementos esenciales para la vida, los mecanismos para su asimilación y los arreglos para su transporte. En resumen, los estudios y compuestos modelo son útiles para comprender el funcionamiento de los sistemas reales. La naturaleza ha usado los iones metálicos en los procesos biológicos, por ello hay que valorar si los iones metálicos pueden incorporarse a los fármacos, y como los compuestos de coordinación son

<sup>2</sup> Bhattacharya, R. & Mukherjee, P. (2008). Advanced Drug Delivey Reviews.60: 1289-1306.

<sup>3</sup> Chen, P.C., Mwakwari, S.C. & Oyelere, A.K. (2008). Nanotechnology, Science and Applications.I: 45-66.



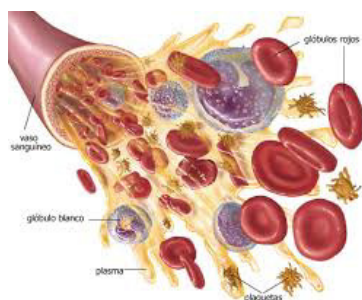
agentes terapéuticos potenciales, tanto si el metal se incorpora de manera fortuita como intencionada.

Fisiológicamente la función de los metales en el organismo humano es muy conocida. Son fundamentales en bajas concentraciones para que el metabolismo de los procesos enzimáticos funcione correctamente.

La ASCO (Sociedad Americana de Oncología Clínica) hace una recopilación de todos los tratamientos actualizados<sup>4</sup>. El cáncer tiene distintos estadios que medicamente están clasificados según su fase de evolución<sup>5</sup>. A día de hoy los tratamientos para esta enfermedad son dispares en función del tipo de cáncer, por ejemplo se emplea la terapia biológica que consiste en un anticuerpo monoclonal<sup>6</sup>, o el tratamiento con Radioterapia donde se utilizan rayos de alta energía para destruir las células cancerosas, y el tratamiento del CCR (Cáncer de Colon Rectal) más aplicado es la cirugía.

Sin embargo, el más estudiado esta siendo la Quimioterapia, donde se usan fármacos para destruir células cancerosas. Estos fármacos entran en el torrente sanguíneo y pueden afectar las células cancerosas de todo el cuerpo. Los fármacos anticancerosos se administran ordinariamente por la vena, aunque algunos pueden darse de forma oral. Los efectos secundarios de la quimioterapia dependen principalmente de los fármacos específicos que se usen y de la dosis. Los fármacos pueden dañar las células normales que se dividen con rapidez, como las sanguíneas y en concreto los glóbulos rojos o hematíes.

Figura. 3. Glóbulos rojos



Estas células combaten las infecciones, participan en la coagulación y llevan oxígeno a todas las partes del cuerpo. Estos fármacos también afectan a las células de las raíces del pelo y a las que revisten el tracto digestivo. Y por ello la quimioterapia tiene efectos secundarios como contraer infecciones, sangrar con facilidad, debilidad, cansancio, caída de pelo, disminución del apetito, náuseas, vómitos, diarrea, o llagas en la boca y labios, alteraciones en la piel de la palma de la mano y pies.

---

<sup>4</sup> ROTH, B. J. et al., 2013. Journal of Clinical Oncology, 31(1): 131-161.

<sup>5</sup> Instituto nacional del cáncer, 24-sep-2010

<sup>6</sup> Rosenberg SA (Jan 1984). Cancer Treat Rep 68 (12): 233-55

En este trabajo se realizan los estudios del efecto del escualeno y de los complejos de oro(III), en la Línea celular Caco-2 PD-7. (Figura.4), estas células procedentes de un adenocarcinoma de colon humano las utilizamos sin llegar a la confluencia, es decir cuando no se han diferenciado a enterocitos normales.

La línea celular Caco2 fue desarrollada por el Dr. Jorgen Fogh, en el Instituto Sloan-Kettering para la Investigación del Cáncer en 1975<sup>7</sup>, esto fue primordial para el avance en el estudio del cáncer.

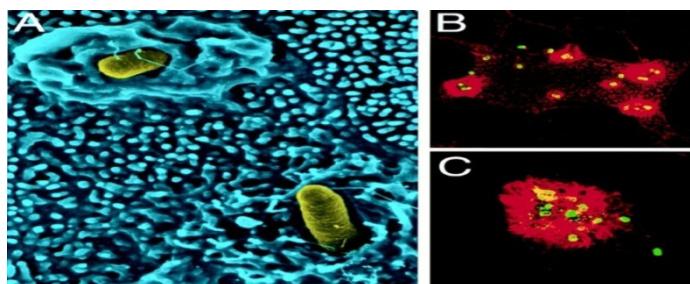


Figura. 4. Línea celular Caco-2

Para desarrollar moléculas que puedan ser utilizadas como fármacosorales hay que realizar estudios de su absorción con el fin de poder ver los problemas de biodisponibilidad que puedan aparecer<sup>8</sup> cuando son administrados por vía oral, y lo más importante es la permeabilidad de los fármacos, lo que ocurre en la membrana intestinal<sup>9</sup>, que se relaciona directamente con el proceso de absorción oral<sup>10</sup>.

Son distintos los métodos desarrollados para poder valorar la permeabilidad intestinal de los fármacos (*in vivo*, *in situ* e *in vitro*)<sup>11</sup> y así poder predecir la adsorción y poder describir los procesos involucrados<sup>12</sup>. Con estas pruebas lo que establecemos es el Coeficiente de Permeabilidad de un fármaco que se basa en un modelo matemático en el que hace una relación de la permeabilidad y el paso a través del intestino<sup>13</sup>. Se denomina coeficiente de permeabilidad aparente (Papp), al coeficiente de permeabilidad que resulta de medir *in vitro* la concentración de un compuesto que pasa de una cámara dadora a otra receptora y que se filtro a través de monocapas<sup>14</sup>.

La línea celular Caco-2, es la que se emplea más en determinaciones de Papp<sup>15,16</sup>, como estos modelos celulares al ser cultivadas sobre filtros semipermeables

<sup>7</sup> Fogh J (J. Fogh, ed.), Plenum, 1975, 115-141

<sup>8</sup> P. Artursson and J. Karlsson. Biophys. Res. Commun., 175, 880 (1991).

<sup>9</sup> H. Lennernas, J. Pharm. Sci., 87, 403 (1998)

<sup>10</sup> G. Trapani, M. Franco, A. Trapani, A. Lopodota, A. Latrofa, E. Gallucci, S. Micelli, G. Liso, J. Pharm. Sci., 93, 2909 (2004)

<sup>11</sup> Y. Tanaka, Y. Taki, Y. Sakane, T. Nadai, H. Sezaki and S. Yamashita, Pharm. Res., 12, 523 (1995).

<sup>12</sup> H. Lennernas, K. Palm, U. Fagerholm and P. Artursson, Int. J. Pharm., 127, 103 (1996).

<sup>13</sup> J.E. Polli and M.J. Ginski, Pharm. Res., 15, 47 (1995)

<sup>14</sup> P. Artursson, K. Palm and K. Luthman, Adv. Drug Deliv. Rev., 46, 27 (2001).

<sup>15</sup> I.J. Hidalgo, T.J. Raub and R.T. Borchardt, Gastroenterology, 96, 736 (1989)

<sup>16</sup> K.L. Audus, R.L. Bartel, I.J. Hidalgo and R.T Borchardt, Pharm. Res., 7, 435 (1990)

forman unas características monocapas que se asemejan a los de la mucosa intestinal y que permiten la cuantificación de Papp en dirección apical-basolateral o basolateral-apical<sup>17, 18</sup>, la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos (FDA) acepta este modelo para determinar la clase de permeabilidad de un fármaco y predecir su absorción<sup>19</sup>.

Nosotros empleamos esta línea celular para estudios del ciclo celular y poder comprobar si tras la aplicación de los agentes terapéuticos de oro(III) en combinación con el escualeno, sufren apoptosis o necrosis o por el contrario quedan vivas.

Cuando una célula va a sufrir apoptosis desencadena una cascada de procesos moleculares característicos que finalizan con la total desintegración de la célula.

Lo importante de este proceso es que muchos de estos cambios que sufre la célula parecen ser únicos a la apoptosis por lo que pueden ser utilizados para identificar este modo de muerte celular<sup>20</sup>, uno de los primeros cambios que ocurren es la deshidratación celular, pérdida de agua intracelular, el citoplasma se condensa produciéndose cambios en su forma y por supuesto tamaño, las células aparecen alargadas, cuando su forma normal es redonda y más pequeñas.<sup>21</sup> La apoptosis produce otro cambio, que parece ser el más característico de este proceso que es la condensación de la cromatina nuclear. Esta condensación se origina en la periferia nuclear, y la cromatina condensada a menudo adquiere una forma cóncava que se asemeja a una media luna. El DNA en la cromatina condensada presenta hipercondensación, (Figura.5), se tiñe de oscuro en preparados de histología<sup>22,23</sup>.

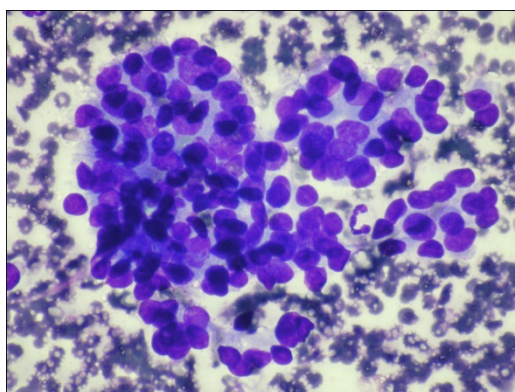


Figura 5

<sup>17</sup> S. Yamashita, Y. Tanaka, Y. Endoh, Y. Taki, T. Sakane, T. Nadai, H. Sezaki, *Pharm. Research*, 14, 486 (1997)

<sup>18</sup> P. Artursson, *Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 8, 305 (1991).

<sup>19</sup> U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Guidance for Industry. CDER-FDA. Rockville MD, USA 2000, pp. 1-16

<sup>20</sup> Antti saraste.Herz 1999 mayo;24(3)189-95

<sup>21</sup> Rodriguez Lourdes y Reyes EsperanzaJorge Alberto.Elfos Scientiae 1995

<sup>22</sup> Ernesto Alfaro Moreno,\* Claudia García Cuéllar,\* Alfonso Dueñas González. *Rev Rev Inst cacerología (Mex)* Vol. 46, N m. 4 Octubre-Diciembre 2000 pp 275-28

<sup>23</sup> Mark M. Comton.*Cancer and Metastasis Reviews*. Vol 11 Issu2,pp105-119

Como podemos apreciar en la imagen con sondas fluorescentes, hay una desintegración de la membrana nuclear y degradación proteolítica de la lamina con fragmentación nuclear. Algunos fragmentos nucleares, parecen gotitas de DNA de diferentes tamaños, dispersos en el citoplasma. Estos fragmentos nucleares junto con los componentes del citoplasma, tanto los que están desintegrados como los intactos, son envueltos por fragmentos de membrana plasmática y forman los cuerpos apoptóticos. Este proceso de formación y expulsión de los cuerpos apoptóticos, cuando ocurre *in vivo*, no tienen por qué ser necesariamente fagocitados por macrófagos, sino que pueden ser fagocitados por células adyacentes como fibroblastos o células epiteliales, y no desencadena ninguna reacción inflamatoria en el tejido.

También en la apoptosis las endonucleasas sufren una activación, y el ADN sufre una desorganización<sup>24</sup>, forma fragmentos, está parcialmente degradado,<sup>25</sup> y es un campo para el estudio de genes<sup>26,27</sup>. En los primeros procesos de la apoptosis la membrana plasmática tiene su estructura y casi todas sus funciones conservadas. Comprobamos así mismo, que las mitocondrias<sup>28</sup> y los lisosomas no sufren deterioro pero el potencial transmembrana de la mitocondria esta disminuido. Además, la fosfatidilserina sufre una exposición en la cara externa de la membrana plasmática por la pérdida de asimetría que sufren los fosfolípidos de la membrana plasmática, el catión calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular se moviliza<sup>29</sup>, hay una activación de las proteínas citoplasmáticas, desaparecen los microtubos. Todos estos cambios que ocurren en la membrana hacen que la célula sea fagocitada.

La muerte celular programada por apoptosis solo ocurre si el proceso ha sido activado, es un proceso individual y no repercute a las células contiguas<sup>30, 31</sup>.

Necrosis, o muerte accidental u oncosis, es un proceso pasivo, catabólico y degenerativo. Es una respuesta celular, generalmente a una lesión y puede ser producida por un conjunto de agentes citotóxicos, donde interviene el pH, hipoxia, hipertermia, trauma directo, etc. Un proceso que ocurre tempranamente en la necrosis es la pérdida de control de la permeabilidad de la membrana plasmática, y por esta pérdida de permeabilidad, aparece un flujo anormal de iones hacia el interior celular que lleva a una entrada de agua pasiva. Esta, provoca que la célula y algunos de sus orgánulos membranosos se hinchen y estallen. Con la rotura de la membrana plasmática se liberan sus componentes, incluyendo enzimas proteolíticas<sup>32</sup>. La

---

<sup>24</sup> Peitsch MC, Mannherz HT y Tschoop J (1994). Trends Cell Biol 4:37-41

<sup>25</sup> Elmore S. Toxicol pathol. 2007, Jun35(4):495-516

<sup>26</sup> Mark M. Compton. Cancer and Metastasis Reviews. Vol 11 Issue2, pp105-119

<sup>27</sup> Takemura G, Kato S, Aoyama T, Hayakawa Y, Kanoh M, Mauruya R, Arai M, Nishigaki K, Minatoguchi. J Pathol. 2001. Apr;193(4):546-56

<sup>28</sup> J.D. Ly, D. R. Grubb, A. Lawen. Apoptosis, March 2003, vol 8, Issue2, pp115-128

<sup>29</sup> Cohen, J.J. And Duke R.C. (1984) J. Immunol. 132:38-42

<sup>30</sup> Raff MC (1992) Nature 356:397-400

<sup>31</sup> Duke RC, Ojcius DM y Young DE (1996) Annu Rev. Sci Amer 52:48-55

<sup>32</sup> Majno G, Joris I. Am J Pathol 1995;146:3-15.

cromatina nuclear también sufre cambios, aparecen unas condensaciones desiguales y el núcleo sufre una cariólisis, una lenta disolución. En el proceso de la necrosis hay una reacción inflamatoria en los tejidos y puede producir la formación de una cicatriz.

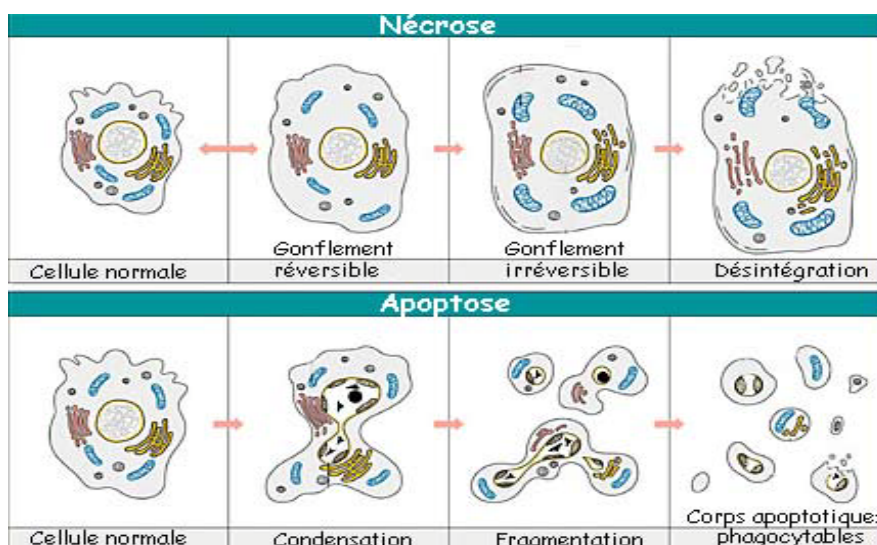


Figura 6. Diferencia entre la apoptosis y la necrosis.

El escualeno fué descubierto en 1906 por el químico japonés Mitsumaru Tsumimoto. Su nombre viene de “escualo”, familia a la que pertenece el tiburón, cuyo aceite se comercializa. Fue Paul Karrer, (premio Nobel de química en 1936<sup>33</sup>) quien identificó su estructura molecular en 1935.

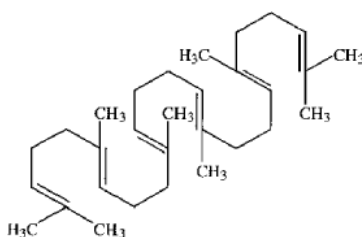


Figura 7. Estructura química del escualeno

Es un compuesto orgánico natural, hidrocarburo polioinsaturado y terpeno, su estructura es similar a la de la vitamina E, contiene 6 grupos isoprenoides. Tiene un peso molecular de 410.7 g/mol, y la fórmula molecular es C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>. Tiene 6 dobles enlaces no conjugados, por lo que es similar a la vitamina E, aunque el Escualeno tiene 6 grupos isoprenoides. Estos grupos isoprenoides son los más potentes antioxidantes

<sup>33</sup> Nobel Lectures, *Chemistry 1922-1941*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1966.

naturales, y es similar a la estructura de la vitamina A, o betacaroteno, que participa en la síntesis de colesterol.

Se encuentra en el cuerpo humano como uno de los principales componentes de la piel. Juega un papel importante como lubricante y como constituyente del tejido adiposo. Además, el escualeno es el principal hidrocarburo encontrado en los aceites de pescado, concretamente en el hígado de algunas especies marinas como el tiburón. Y la principal fuente de origen vegetal es la aceituna. Suministra O<sub>2</sub> a las células, penetra a través de las membranas celulares, facilita la absorción de nutrientes. El escualeno destaca por su gran capacidad de recibir o donar electrones sin sufrir una alteración molecular. La configuración antioxidante tan estable y efectiva del escualeno está dada por las seis unidades isoprenoides que lo componen.

Se están haciendo estudios sobre su repercusión en el cáncer donde se valora el aumento de ingesta<sup>34</sup>. Estos estudios están basados en la capacidad de la catálisis de la reductasa HMG-COA *in vivo*, actuando sobre el oncogén ras<sup>35,36</sup>, reduciendo su actividad. Se está estudiando el efecto del Escualeno para aumentar el efecto de algunos medicamentos hipocolesterolemizantes y se valora en la clínica el efecto que pueda tener por su gran afinidad por los fármacos no ionizados<sup>37</sup>.

Cuando se introducen fármacos, cuya base son metales, en el organismo están expuestos a reaccionar con muchas sustancias. Las dianas de estos agentes son el ADN y proteínas de las células. Se forman complejos de metal con sustancias que pueden alterar su composición. Estos compuestos tienen ligandos que se pueden mover con facilidad y pueden reaccionar con moléculas y con iones simples que están en el torrente circulatorio. La química biológica de los fármacos del metal está teniendo una gran demanda y se estudia para que estos agentes sean más efectivos.

Las proteínas son un objetivo para estos metales. Sabemos que en el cuerpo humano hay decenas de miles de proteínas distintas, relacionadas con distintas funciones, por ello si un ion de metal en forma de fármaco metálico entra en el organismo y se une a una proteína, podría alterar su función biológica, la célula podría morir.

Los complejos de platino tienen un gran potencial en relación con su excelente efecto anticancerígeno. Se está viendo un efecto beneficioso del tratamiento de diferentes cánceres con cis-diamino-dicloro-platino (II) (cisplatino), cis-diamino-

---

<sup>34</sup> Newmark HL.. Ann New York Acad Sci 1999; 889:193-203

<sup>35</sup> Lowy DR, Willumsen BM. Annu Rev Biochem 1993; 62:851-891

<sup>36</sup> Milburn MV, Tong L, DeVos AM et al. Ciencia 1990; 247:939-945.

<sup>37</sup> Gregory S. Kelly, N.D.. Altern Med Rev 1999;4(1):29-36.



(ciclobutano-1,1-dicarboxilato)-platino (II) (carboplatino) y [ciclohexano-1,2-diamino-N,N'-oxalato(2-)-O,O]-platino (II)(oxaliplatino)<sup>38</sup>.

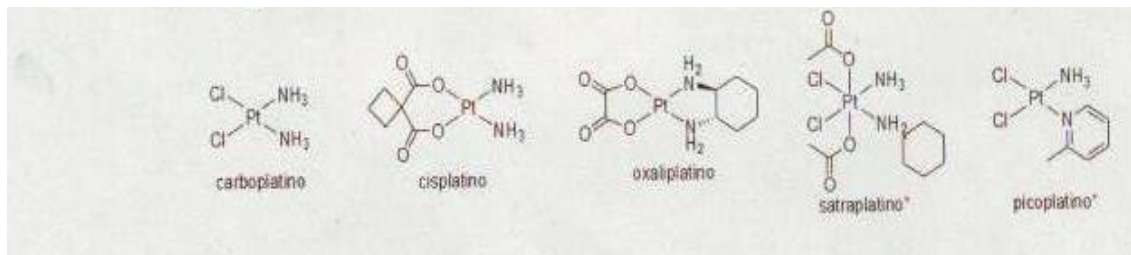


Figura 8. Complejos de Platino empleados en quimioterapia para el tratamiento de varios tipos de cáncer

La idea de investigar las propiedades anticancerígenas de cisplatino nació de un descubrimiento casual hecho por el Barnett Rosenberg<sup>39</sup>, profesor de biofísica en la Universidad de Michigan, pionero en el desarrollo del cultivo celular. En el diseño y evaluación de nuevos tratamientos del cáncer, los investigadores utilizan el cisplatino como el estándar respecto al cual se comparan los nuevos medicamentos.

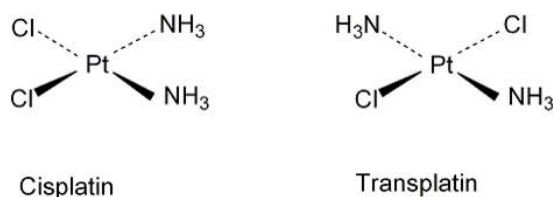


Figura 9. Complejos plano cuadrado del cis-platino y del transplatin.

El cisplatino es un buen medicamento, pero actualmente se pretende hallar otros compuestos que se puedan aplicar con una dosis menor y que tengan menos efectos secundarios<sup>40</sup>.

El cisplatino tiene efectos perjudiciales a distintos niveles, renal, homeostático, neuropatías periféricas, vómitos, diarreas etc. Este efecto aumenta con un tratamiento prolongado, pudiendo llegar a no remitir<sup>41</sup>.

El Oro(III) es isoelectrónico al Platino(IV) lo que nos lleva a pensar que podría ser bueno para estos estudios, y ayudar a minimizar los efectos adversos provocados por los derivados de platino.

Se sabe que el oro es el metal más noble que existe, es dúctil y maleable y es el único inerte al agua, oxígeno y azufre, incluso si las temperaturas son elevadas. Tiene el número atómico 79, y está incluido en el grupo 11 de la tabla periódica, pero tenemos que tener en

<sup>38</sup> Ara G, Kusumoto T, Korbut TT, Cullere-Luengo F, Teicher BA. Cancer resv1994.mar15(j)6(1497-502)

<sup>39</sup> Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. (1965). *Nature* 205 (4972): 698–9

<sup>40</sup> Rebecca A. Alderden, Matthew D. Hall, and Trevor W. Hambley (2006). *J. Chem. Ed.* 83: pp. 728–724.

<sup>41</sup> Dhara, S. C. (1970). 8: pp. 193–134.

cuenta que es atacado por halógenos y se disuelve en agua regia ( $\text{HNO}_3:\text{HCl}$ ) para dar ácido tetracloroáurico (III)  $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ .

Tiene 3 estados de oxidación I, II, y III. Pero tan solo  $\text{Au(I)}$  y  $\text{Au(III)}$  están presentes en medicamentos y complejos biológicos con oro. Esto quizás es debido a que el  $\text{Au(II)}$  sería un intermedio entre  $\text{Au(I)}$  y  $\text{Au(III)}$ .

Algunos de los fármacos de primera generación de oro que nos encontramos son los siguientes:

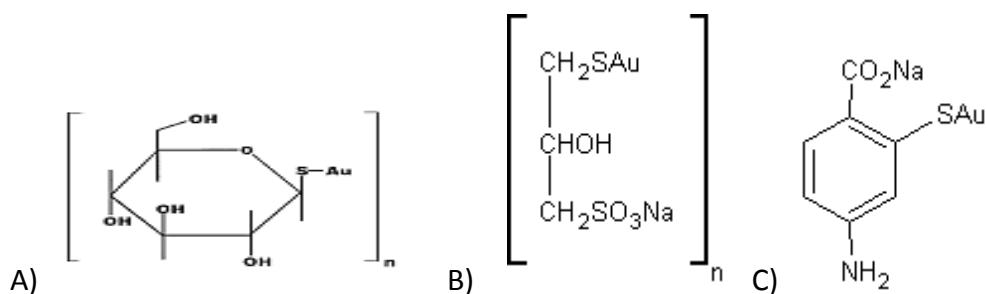


Figura.10. A) Solganol(aurotioglucosa). B) Alocrisina (sulfonato aurotiopropanol). C) Crisolgan (ácido 4-amino-2-mercaptobenzoico sodio oro)

Todos ellos presentan coordinación lineal del oro (I), donde el oro está enlazado a dos átomos de azufre. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* su efecto antitumoral<sup>42, 43</sup>. Los dos primeros son las más importantes. Los tratamientos con oro (I) son dolorosos y además el oro produce nefrotoxicidad por acumulo en el riñón lo que obliga a suspender el tratamiento.

La segunda generación de complejos de Au (I) con fosfinas y sus derivados, son de fácil preparación, muy estables y solubles en grasas. Se administran oralmente, esto lleva a poder dar menos dosis/día, y presentan una acción antiinflamatoria, por lo que se evita la administración de AINE (antiinflamatorio no esteroideo).

. El mecanismo de actuación del Auranofin es similar al cisplatino. Además se ha conseguido una disminución de la toxicidad renal<sup>44</sup>.

<sup>42</sup> Ward, J.R. (1988). Am. J. Med. 85, 39–44.

<sup>43</sup> Ahmad, S., Isab, A.A., Ali, S., and Al-Arfaj, A.R. (2006) 1633–1645.

<sup>44</sup> Berners-Price, S.J., Girard, G.R., Hill, D.T., Sutton, B.M., Jarrett, P.S., Faucette, L.F., Johnson, R.K., Mirabelli, C.K. & Sadler, P.J. (1990) J. Med. Chem. 33: 1386–1392.



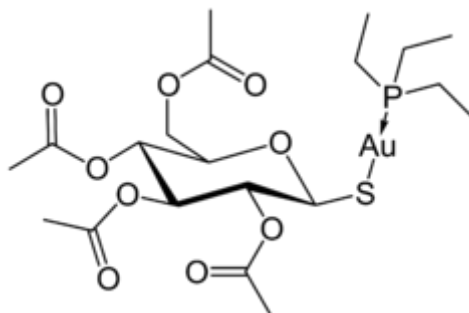


Figura 11. Auranofin (2,3,4,6-tetraacetato de 1-tio-8-D-glucopiranosato de trietilfosfina oro(I)).

Tras el éxito de los compuestos de oro como fármacos antiartríticos, el esfuerzo ahora se centra no solo en nuevos compuestos contra la artritis reumatoide que tenga una menor toxicidad y efectos secundarios; si no también en la búsqueda de compuestos de oro con efecto antitumoral.

En 1863 se empezó a estudiar la relación del cáncer y el oro, y a partir de 1980 se centro el interés por el posible efecto antitumoral<sup>45</sup> de estos compuestos. Desde entonces, podemos encontrar muchos estudios sobre los derivados de oro (I), en cambio los derivados de los complejos de oro(III) son tema de actualidad<sup>46</sup>. Una característica de oro(III) es que es isoelectrónico como el Pt(II), y este metal ya tiene más que demostrada su actividad anticancerígena. Se están encontrando compuestos que no dan importantes problemas de toxicidad y su estudio está siendo llevado a cabo por bioquímicos relevantes<sup>47,48</sup>.

Al igual que los complejos de oro(III), las nanopartículas de oro están siendo estudiadas actualmente como vehículos para la administración de fármacos, con el objetivo de ser aplicados más selectivamente y reducir sus efectos secundarios.

Las nanopartículas presentan gran variedad de tamaños, formas y propiedades (figura 11). Si la partícula también está equipada con una característica de reconocimiento celular tal como un anticuerpo, el conjunto resultante se convierte en un sistema altamente específicos para los agentes quimioterapéuticos y además de tratar las enfermedades, las nanopartículas tienen un potencial para la detección de enfermedades. Pero aunque la aplicación de la nanociencia y la nanotecnología a la medicina, llamada la nanomedicina por algunos, abre grandes campos de las ciencias medicas, no podemos olvidar que estas partículas nanoestructuradas son totalmente ajenos al entorno biológico del cuerpo pudiendo representar importantes riesgos para

<sup>45</sup> M.C. Gimeno, M. Laguna: Anuales R.S.E.Q. Abril-Julio (2000)

<sup>46</sup> Daniela Saggioro, Lucia Paloschi, Alessandra Folda, Stephen A. Moggach, Simon Parsons, Luca Ronconi, Dolores Fregona\* and Alberto Bindoli\*. Chemistry & Biology 14, 1128–1139, October 2007

<sup>47</sup> Parish, R.V. R.V. Parish. Interdiscipl. Sci. Rev., (1992). 17. 3, pp 221.228.

<sup>48</sup> Daniela Saggioro, Lucia Paloschi, Alessandra Folda, Stephen A. Moggach, Simon Parsons, Luca Ronconi, Dolores Fregona\* and Alberto Bindoli\*. Chemistry & Biology 14, 1128–1139, October 2007

la salud humana, sobre todo si se introducen directamente al organismo en forma de fármacos terapéuticos o agentes de diagnóstico. Es necesario evaluar los riesgos para la salud de los nanomateriales.

Por todos estos motivos **los objetivos** que se plantearon al inicio de este trabajo fueron los siguientes:

- Estudiar la eficacia antitumoral de tres complejos organometálicos de oro(III) y del escualeno en células Caco-2, (PD7) indiferenciadas.
- Realizar estudios farmacodinámicos para calcular la supervivencia celular mediante la prueba de MTT.
- Realizar estudios de citometría de flujo para evaluar la apoptosis y el ciclo celular en los compuestos seleccionados según su IC<sub>50</sub>.
- Aprender las técnicas básicas de investigación en un laboratorio de Biología Celular y realizar estudios bibliográficos para aumentar el conocimiento sobre el tema.

# **PARTE EXPERIMENTAL**

### ***3-PARTE EXPERIMENTAL: ESTUDIOS BIOLÓGICOS***

---

Los experimentos de citotoxicidad “in vitro” se realizaron en el laboratorio de Fisiología Animal del Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

#### **3.1-ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS: CÁLCULO DE IC<sub>50</sub>.**

El cultivo de células ha sido considerado durante mucho tiempo como una mezcla de ciencia y arte, se plantea como una técnica difícil de aprender. Sin embargo estas dificultades tradicionales, están hoy en día prácticamente superadas gracias a factores como la disponibilidad de antibióticos, de fungicidas, de medios de composición definida, instalaciones asépticas y dispositivos de cultivo.

Los avances técnicos y la aparición de un buen número de compañías comerciales de suministro de medios, sueros, equipos y líneas celulares han hecho del cultivo celular una técnica con buena reproducibilidad.

Todos los trabajos de manipulación realizados con cultivos celulares y la realización de los experimentos se hicieron en campana de flujo laminar vertical de clase II (Telstar AV-100), para proteger tanto al operador como a las células. En todo momento, se realizaron siguiendo el protocolo de trabajo existente, cuya secuencia de pasos se detalla a continuación:

- 1) Se enciende la luz ultravioleta, que tiene propiedades bactericidas y se deja actuar 30 minutos.
- 2) Seguidamente, se enciende el flujo de aire en posición máxima, se quita la tapa frontal, y se deja circular el aire, al menos durante 15 minutos, para que se estabilice el flujo.
- 3) Se limpia la zona interior de trabajo con alcohol 70%, como medida de asepsia.
- 4) Al empezar a trabajar, se apaga la luz UV para evitar dañar los ojos del operador y se enciende la luz blanca de la campana (no antes, para evitar que se acumule calor)
- 5) Se introduce poco a poco el material de trabajo dentro de la campana, limpiando previamente con alcohol 70%, evitando acumular mucha cantidad, ya que se puede obstaculizar el flujo de aire en el interior de la campana.
- 6) Es conveniente cerciorarse, de tener preparadas y colocadas en buena posición las papeleras para material de desecho, y posteriormente se enciende la bomba de vacío, verificando que el recipiente de recogida de líquidos no esté lleno. Este recipiente contiene una solución de hipoclorito de sodio al 10%.

- 7) Antes de empezar a trabajar dentro de la campana, es imprescindible lavarse bien las manos con jabón , y posteriormente con alcohol 70% o esterilium (solución desinfectante para la piel). Esta última acción, se debe repetir cada vez que se manipulaba algo fuera de la campana.
- 8) En todo momento se debe trabajar con cuidado dentro de la campana, sin hacer movimientos bruscos y sin acumular material innecesario, además no se debe hablar, ya que es una fuente de micoplasmas.
- 9) Solamente se utiliza material y medios propios, que deben estar todos marcados y especificados su uso, fecha preparación, etc.
- 10) Al finalizar el trabajo, y después de retirar todo el material, se debe limpiar bien la superficie de trabajo con alcohol, limpiando igualmente (con alcohol) el conducto de absorción que lleva al erlenmeyer de filtración a vacío (kitasato). Si alguien va a trabajar en la campana en un corto periodo de tiempo, se deja el flujo de aire en posición media.

Además al realizar cualquier trabajo, se tienen en cuenta las siguientes normas de bioseguridad:

- Utilizar equipos de protección individual adecuados (guantes, mascarilla, gorro, calzas, gafas) en función del trabajo a realizar.
- Lavado de manos antes y después de cualquier manipulación.
- No tocarse el cuerpo mientras se está trabajando con material biológico.
- No comer, beber, fumar, ni llevar cosméticos en el área de manipulación.
- No pipetear nunca con la boca.

Para el crecimiento y mantenimiento de las líneas celulares utilizadas, se empleo una estufa de incubación (Haeraeus BB16) a una temperatura constante de 37°C, y una atmosfera humidificada con un 95% de O<sub>2</sub> y un 5% de CO<sub>2</sub>. En la bandeja de la parte inferior de la estufa, se ponen aproximadamente 4 litros de agua destilada, a la cual se añade un desinfectante (Bathcleanen Sigma) a la dosis de 0,16 mL/litro agua para evitar posibles contaminaciones.

Para la eliminación de contaminantes potenciales del material utilizado en el cultivo celular: como botellas, instrumentos de vidrio o el agua utilizada en los medios, se deben tratar de formar rutinaria mediante autoclave. Además de los materiales indicados anteriormente, se utilizó también:

- Baño termostatzado.
- Material de plástico rígido estéril: tubos cónicos, placas 96 pocillos,...
- Pipetas estériles de diferentes tamaños y Pipetboy

- Microscopio de luz invertida Olympus CK2 para visualizar y examinar, en contraste de fases, el tapiz celular de las cajas de cultivo, y realizar el recuento de células.
- Cámara de Neubauer utilizada para el recuento de células.
- Centrifuga 5810 Eppendorf

#### **A) PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO.**

Cada tipo celular, requiere unas condiciones y unos medios de cultivo específicos. Para el mantenimiento habitual de la línea celular Caco-2 en el laboratorio, se utilizó el medio Modificado Dubelcco's Eagle (DMEM)

Su composición, en mg/l es la siguiente:

CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 264; Fe(NO<sub>3</sub>).9H<sub>2</sub>O 0,1; KCl 400; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 200; NaCl 6400; NaHCO<sub>3</sub> 3700; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 141; glucosa 4.5 g/L; rojo fenol 15; hipoxantina 13,6; inositol 4; L-arginina 84; L-cistina 48; L-glutamina 584; glicina 30; L-histidina 42; L-isoleucina 105; L-leucina 105; L-lisina 146; L-metionina 30; L-fenilalanina 66; L-serina 42; L-treonina 95; L-valina 94; cloruro de colina 4; ácido fólico 4; nicotinamida 7,2; piridoxal 4; riboflavina 0,4; timina 4 (Gibco BRL)

Este medio es suplementado con:

- Solución de aminoácidos no esenciales (Gibco BRL) 1:100
- Solución de penicilina- estreptomycin (1000 U/ml de penicilina, 1000µg/ml de estreptomycin, Gibco BRL) 1:100.
- Solución de anfotericina B (250U/ml, Gibco) 1:100
- Solución de L-Glutamina 200mM 100X (Gibco BRL): si el medio ha sido preparado hace más de un mes, debe añadirse de nuevo ya que, la glutamina se degrada.

La preparación del medio que permite el crecimiento del cultivo celular se realizó dentro de la campana de flujo laminar, su composición se detalla a continuación:

|                                     |       |
|-------------------------------------|-------|
| Medio DMEM con glucosa              | 400ml |
| Penicilina/Estreptomycin 100X       | 5ml   |
| Aminoácidos no esenciales (AANE)10M | 5ml   |
| L-Glutamina. 200mM 100X             | 10ml  |
| Anfotericina B                      | 5ml   |
| Suero fetal bovino (SFB)            | 100ml |

Una vez preparado se conserva en frigorífico a 4°C hasta su uso. Para evitar un choque térmico sobre las células, antes de su utilización debe ser calentado a 37°C en un baño termostático.

## **B) PREPARACIÓN Y MANTENIMIENTO DE LA LINEA CELULAR.**

El mantenimiento de una línea celular estable, se realiza mediante congelación de la misma en Nitrógeno líquido. Para su utilización posterior se introduce en baño a 37°C, el tiempo necesario hasta su descongelación.

Posteriormente, se toman 5 ml de medio de cultivo, se vierten en un tubo cónico y se añade el vial de células ya descongeladas. Se homogeniza bien y se pasa esta mezcla a una caja de 25 cm<sup>3</sup> para su crecimiento.

Para realizar el cambio de cultivo, se sacan las cajas de la estufa de incubación, asegurando que el tapón este bien cerrado y se observan al microscopio para comprobar su crecimiento.

Posteriormente se llevan a la cámara de flujo laminar, donde se aspira el medio con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío, teniendo cuidado de no llevarse las células, para lo cual se aspira el líquido en el ángulo opuesto al que estén las células. Se añade el medio de cultivo nuevo, a temperatura ambiente, con pipeta. Además deben seguirse todas las reglas necesarias para que los procedimientos se realicen bajo una atmosfera estéril en campana de flujo laminar. Para cajas de 25cm<sup>3</sup>, se añaden 5 ml de medio y se cambia cada 2 ó 3 días. Una vez añadido el medio, se vuelve a colocar la caja en posición horizontal dentro de la estufa con el cuello hacia arriba y con el tampón ligeramente abierto para permitir la entrada de oxígeno, y evitar que las células mueran.

## **C) SEPARACIÓN DE CÉLULAS/ TRIPSINIZACIÓN.**

Cualquiera que sea la utilización de las células, la individualización se realiza sobre células en multiplicación, es decir, antes de la confluencia, cuando las células ocupan de 60 al 70% de la superficie de soporte de cultivo.

Aproximadamente esta operación debe realizarse 6-7 días tras la siembra (pero siempre previa observación al microscopio, para confirmar el crecimiento de las células). Para la obtención de pasajes de las células antes de alcanzar la confluencia, se utilizo el método de tripsinización, ya que nuestros cultivos son adherentes y es necesario despegarlos del recipiente para su manipulación. Se empleó Tripsina-EDTA (g/L): Tripsina 5, EDTA 2 y NaCl 8,5 (Gibco BRL) sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Si no se tripsiniza la

monocapa, crecería hasta alcanzar cerca del 100% de confluencia (máxima capacidad de cubrimiento de superficie); pasada esta etapa, el crecimiento se detiene por inhibición por contacto y las células pueden comenzar a degenerar, despegarse y morir. No obstante, algunas variantes de células tumorales son capaces de “apilarse” y dar lugar a multicapas.

### ***Trypsinización para una botella de 25cm<sup>2</sup>.***

Se lleva a temperatura ambiente el medio de cultivo y el PBS diluido (100ml de PBS comercial en 400ml de agua destilada), así como la mezcla de tripsina, EDTA y PBS (50ml de agua destilada + 5,5ml de PBS 10X + 7,7 ml de tripsina 10X +7,7 ml de EDTA 10mM).

Procedimiento:

- 1) Se retira el medio de cultivo de la caja
- 2) Se añaden 5 ml de solución de PBS diluida para lavar las células, realizando movimientos ligeros de la caja para asegurar un lavado correcto de estas.
- 3) Se aspira el PBS.
- 4) Se añaden 2 ml de la solución de tripsina, EDTA y PBS precalentando a 37°C, cantidad suficiente para cubrir la superficie de la caja donde crecen las células. Tras añadir la solución, se incubaba la caja, bien cerrada, durante 10 minutos en la estufa.
- 5) Pasados los 10 minutos, se retira la caja de la estufa y con ligeros golpes se desprenden las células de la superficie. Se homogeniza con una pipeta Pasteur, deslizando el líquido que había quedado en el fondo (10-15 veces) con una pipeta, evitando que queden grumos o agregados celulares para facilitar así su conteo y una correcta siembra posterior.
- 6) Se cogen estas células en suspensión y se vierten en un tubo cónico estéril al que previamente se ha añadido 10 ml de medio de cultivo.
- 7) Se centrifuga durante 5 minutos a 900g (ó 3900rpm), a temperatura ambiente.
- 8) Una vez centrifugado, se aspira el sobrenadante del tubo cónico con movimientos circulares, teniendo cuidado de no aspirar las células que han quedado depositadas en el fondo.
- 9) Se añaden 10 ml de medio de cultivo y se homogeniza evitando la formación de burbujas (quedan células en suspensión)
- 10) Por último, se determina la densidad celular para poder hacer la siembra posterior.



### ***Determinación de la densidad celular.***

Se emplean diferentes técnicas: desde la relativamente simple cámara de conteo celular de la que existen numerosas variantes (entre ellas la cámara de Neubauer), hasta equipos automáticos de conteo celular como el "Cell Counter". En nuestro caso se utilizó una cámara de Neubauer, adaptada a un microscopio. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula

Para ello, se toma 0,5 ml de la mezcla de células y se depositan en un tubo Eppendorf (de esta forma se evita contaminar el resto) y se lleva fuera de la campana. De este tubo, se toman 20  $\mu$ L al que agregamos 100  $\mu$ L de colorante Azul Trypan (dilución 1:6). Este colorante, permite diferenciar las células viables de las no viables, que se tiñen de azul al estar alterada la permeabilidad de su membrana plasmática.

Se toman una muestra de esta mezcla y se coloca en la cámara de Neubauer. Se deben contar las células existentes, en las dos cuadrículas pequeñas que hay en el centro, con ayuda de un microscopio de luz invertida.

Una vez contadas las células, se puede calcular cuántas hay por mL. Para ello se tiene en cuenta, que la profundidad de la cámara de Neubauer que es de 0,1mm (que es lo mismo que 0,1  $\mu$ L). Si la media del conteo celular es X células, se debe multiplicar por 6 (que es el factor de dilución).

$$\text{Nº células} / 0,1 \mu\text{L} = \text{Promedio del recuento celular} \bullet 6$$

Si en 0,1  $\mu$ L hay X células, se calculan cuántas células habrá por mL, es decir en 1000  $\mu$ L, multiplicando el dato por  $10^4$ , así se obtendrá el número de células (nºcélulas/mL).

### **D) SIEMBRA DE CÉLULAS.**

Una vez llevado a cabo la tripsinización de las células, se realiza su siembra en cajas de 96 multipocillos. Para que la siembra de células sea eficaz, se recomienda sembrar 40.000 células por pocillo en las placas de 24 pocillos ( $V_{\text{pocillo}} = 1 \text{ mL}$ ), calculando el volumen necesario a partir del conteo (nºcélulas/ mL). En nuestro caso, como tenemos 96 pocillos de 100  $\mu$ L cada uno, se deben sembrar 4.000 células por pocillo (para obtener la proporción recomendada), por tanto se necesitan un total de 384.000 células por placa. De esta manera, se puede calcular el volumen necesario que

habría que tomar para tener ese número de células. Se mezcla con 9.6 mL de cultivo y se homogeniza bien la mezcla.

Posteriormente, depositando 100  $\mu$ L de la mezcla en cada pocillo, se lleva la caja a la estufa de incubación, con el tapón ligeramente abierto para permitir la entrada de aire. A las 24 horas se observa el aspecto de las células, considerando que de esta forma, todas las células viables tendrían tiempo suficiente para adherirse a la superficie de la caja.

### ***Tratamiento con compuestos de Oro.***

Después de la siembra de células y tras 24 horas en la incubadora a 37°C y en las condiciones adecuadas de humedad, las células se adhieren al fondo del compartimento. Estas células no han llegado a la confluencia, por tanto, son células indiferenciadas cancerosas. Se realizó el tratamiento con compuestos de oro, añadiendo a los mismos en el rango 0-20  $\mu$ M disueltos en el medio de cultivo.

Se dejan las placas en la estufa de cultivo durante 72 horas, transcurrido este tiempo se procede a su cuantificación. Para ello se emplea un ensayo colorimétrico estándar de MMT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), basado en la reducción metabólica del MMT, de color amarillo a formar un compuesto de color azul.

Este método es simple y se usa para determinar la viabilidad celular, dada por el número de células presentes en el cultivo capaces de medirse mediante la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células viables, el MMT es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial, a su forma insoluble *Formazán*.

La capacidad de las células para reducir al MMT, constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional y es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MMT a Formazán, después de su exposición a un compuesto, permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular aunque también puede usarse para evaluar la citotoxicidad, de ciertos medicamentos y/o determinadas sustancias tóxicas. La cantidad de células vivas, es proporcional a la cantidad de Formazán generado en el proceso, para cuantificarlo se utiliza Dimetilsulfóxido (DMSO), que disuelve el Formazán, generando, una disolución de color púrpura, cuya absorbancia puede cuantificarse mediante espectrofotometría.

Este estudio nos permite determinar el valor de  $IC_{50}$ , medida de la efectividad de un determinado compuesto, generalmente una droga, en la inhibición de una función bioquímica o biológica. Este dato indica la cantidad de compuesto necesaria para inhibir un proceso a la mitad, en nuestro caso, se refiere a la concentración de compuesto necesaria, para reducir a la mitad la concentración de células responsables del cáncer estudiado.

La metodología seguida se describe a continuación:

1. Reconstruir el vial de MMT-Thiazoly Blue Tetrazol Bromide- (sigma ref.: M5655- 100mg) con 20mL de PBS estéril (5mg/mL). Calentar en el baño a  $37^{\circ}C$  durante 5 minutos.
2. Añadir a cada pocillo 1/10 del volumen de medio de MMT (5mg/mL).
3. Agitar durante 5 minutos en el agitador/ plataforma orbital.
4. Incubar a  $37^{\circ}C$  (incubador) durante 4 horas.
5. Eliminar el medio + MMT de las placas en la fregadera con un golpe seco.
6. Secar con papel secamanos.
7. Añadir el volumen inicial de cada pocillo de DMSO.
8. Resuspender cada pocillo con ayuda de una micropipeta.
9. Leer con el espectrofotómetro. (absorbancia 560/670)

A partir de las absorbancias de las disoluciones de DMSO, se puede estimar el número de células vivas, existentes en los diferentes compartimentos de placas. Observando las coloraciones obtenidas para cada una de las placas, se puede ver que las coloraciones más intensas, corresponden a los pocillos cuya concentración de producto es menor, es  $0 \mu M$ , indicando así mayor cantidad de células vivas,  $20 \mu M$ , su coloración es menos intensa, por tanto, hay más células muertas.

Las absorbancias obtenidas para la concentración de  $0 \mu M$ , son utilizadas como control de referencia. Este valor, es el máximo valor de absorbancia obtenido, a partir de este dato se puede calcular la absorbancia correspondiente a las células muertas para las distintas concentraciones de producto,  $A_{vn}$  (absorbancia células muertas), restado a este valor de Absorbancia máxima (control- referencia  $0 \mu M$ ), las distintas absorbancias obtenidas para cada concentración.

Una vez conocida la Absorbancia de células muertas ( $A_{vn}$ ) se calcula la relación células vivas con respecto células muertas ( $A_v / A_{vn}$ ).y representamos los logaritmos de las distintas concentraciones ( $\log[]$ ), frente a los logaritmos de las relaciones de Absorbancia, de células vivas con respecto muertas ( $\log [A_v / A_{vn}]$ ).

La grafica se ajusta a una línea recta de pendiente negativa ( $y = -ax+b$ ), cuya ordenada en el origen (O.O.) nos permite calcular el valor de  $IC_{50}$ . Puesto que en este punto, la Absorbancia de células vivas es igual a la Absorbancia de células muertas, ( $\log [A_v / A_{vn}] = 0$ ;  $[A_v / A_{vn}]=1$ ;  $[A_v] = [A_{vn}]$ ), la concentración en este punto será el  $IC_{50}$ .

Para tener datos fiables realizamos por cuadruplicado para cada una de las concentraciones y analizando 4 productos por placa. Además se realizaron tres veces para cada compuesto.

### **3.2. ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS: APOPTOSIS Y CICLO CELULAR.**

Los experimentos de toxicidad “in vitro” de Apoptosis y Ciclo Celular mediante la técnica de citometría de flujo (CMF), se realizaron en el Centro de Investigación Biológica de Aragón. (CIBA)

La preparación del material para la citometría de flujo, consiste en conseguir dispersados celulares, en los que se aíslan los núcleos, mediante destrucción del citoplasma con pepsina o detergentes. Los núcleos son marcados con fluorocromos, que se unen estequiometricamente con los ácidos nucleídos, por lo que la emisión de fluorescencia, es directamente proporcional a la cantidad de DNA nuclear.

Los fluorocromos más frecuentemente usados son: Ioduro de Propilio, Bromuro de Etidio y DAPI. Estos tienen afección tanto por el RNA como por el DNA, por lo que es necesario eliminar las cadenas de RNA. Esto se consigue, incubando la suspensión celular con RNAasa, antes de la tinción con el fluorocromo.

Cuando la célula se muere, se abren poros en la membrana, lo que permite la entrada de colorantes que se unen al DNA; estos colorantes, serían incapaces de atravesar la membrana intacta. ( protocolo seguido en el centro de Investigación Biológica de Aragón, (CIBA)).

El tratamiento realizado a las células Caco-2 para los clones PD7, es el mismo procedimiento, que el realizado en los estudios farmacodinámicos de citotoxicidad mediante la técnica del MTT, pero en esta ocasión, las células son sembradas, en botellas de 75cm<sup>2</sup> ( 15ml), en vez de en placas, y tras 24 horas de incubación, son tratadas con nuestro compuesto: oro y el escualeno, añadidos en concentraciones 20µM. Se dejan actuar durante 72 horas en la estufa de incubación y posteriormente se recogen las células que están resuspendidas en el medio de cultivo, y se tripsinizan las placas. Se recogen todas las células y se realiza una citometría de flujo.

#### ***Protocolo de apoptosis:***

El protocolo a seguir en la preparación de las células, una vez tratadas con el complejo de oro, para medir su apoptosis es el siguiente:

1. Preparación del tampón de Anexina V: Hepes 10 mM / NaOH (Ph 7.4), NaCl 140mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM.

2. Previamente debe prepararse un control negativo con células no tratadas, que se utilizan para definir el nivel basal de células vivas, necrosis y apoptosis.
3. Centrifugar y recoger las células, después lavarlas con PBS atemperado (tampón salino fosfato).
4. Resuspender las células en buffer y Anexina V preparado en concentración  $1 \times 10^6$  cel/ml.
5. Añadir 5  $\mu$ L Anexina V- FITC y 5  $\mu$ L de Yoduro de Propidio por cada 100  $\mu$ L de suspensión celular.
6. Incubar las células durante 15min a temperatura ambiente (25°C) y en oscuridad.
7. Tras el periodo de incubación añadir 400  $\mu$ L de tampón Anexina. Analizar en citómetro de flujo tras una hora.

***Protocolo ciclo celular con ioduro de propidio:***

El protocolo a seguir en la preparación de las células, una vez tratadas con el complejo de oro, para determinar su ciclo celular viene detallado a continuación:

1. A partir de  $10^6$  células resuspendidas en 200  $\mu$ L de PBS.
2. Añadir poco a poco 1 mL de Etanol 70%, frio, mezclando continuamente en el vortex.
3. Preferiblemente, dejar 24 horas incubando en nevera. La incubación se puede realizar en 30 minutos, aunque la calidad de los resultados es inferior.
4. Las células pueden guardarse una semana en este paso.
5. Centrifugar a 2000rpm durante 5 minutos. Descartar el sobrenadante.
6. Añadir 1mL de PBS y centrifugar a 2000rpm durante 5 minutos. Descartar sobrenadante.
7. Añadir 1mL de tampón de marcaje (PBS 1x; Ioduro de propidio 50  $\mu$ g/mL; RNAasa A 100  $\mu$ g/ML).

# **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**



Diversas revisiones bibliográficas nos indican que estos compuestos pueden ser empleados como agentes anticancerígenos. Bien es verdad que todos los que se han estudiado con anterioridad solo contienen uno o dos átomos de cloro, es decir pertenecen a los llamados complejos ciclometalados. En nuestro caso se han estudiado dos aductos de oro(III), el A-1 y el A-3, y en el caso del A-3 el oxígeno no se encuentra como ligando puente. Además, contamos con un compuesto no metal, el escualeno, considerado “un buen alimento celular”.

Así mismo, en trabajos previos en los que ha colaborado nuestro grupo de investigación, se han estudiado complejos de Oro(III), concretamente un derivado de ditiocarbamato,  $[\text{Au}(\text{S}_2\text{CN}(\text{CH}_2\text{Ph})_2)_2]\text{Cl}$  en estudios de clones de PD7, obteniéndose un valor de  $\text{IC}_{50}=30.48 \pm 7.17$ . Mejorando los resultados del cis-platino.

Por todo ello, hemos querido ensayar como agentes terapéuticos nuestros compuestos realizando los siguientes estudios:

#### **4.1.-ESTUDIOS FARMACODINÁMICOS: CÁLCULO DE $\text{IC}_{50}$ .**

Los experimentos de citotoxicidad “in vitro”, se realizaron en el laboratorio de Fisiología Animal del Departamento de Farmacología y Fisiología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Aplicamos el método MTT siguiendo los protocolos especificados en la parte experimental.

En general se buscan complejos que presenten un bajo valor de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ), ya que a menor valor de  $\text{IC}_{50}$ , menos cantidad de compuesto o dosis y probablemente cause menores efectos secundarios. La medida del  $\text{IC}_{50}$  muestra la cantidad óptima para reducir a la mitad la cantidad de células cancerígenas. Los valores obtenidos del  $\text{IC}_{50}$  que hemos estudiado se muestran en la Tabla.1.

No en todos los estudios hemos podido obtener las graficas correctas para el cálculo de este valor, probablemente se deba a errores experimentales. Con los datos obtenidos, se puede decir que los valores del  $\text{IC}_{50}$  en general no son óptimos. Se considera que un valor de  $\text{IC}_{50}$  bueno debe estar por debajo de 4 ( $\mu\text{M}$ ).

Hay que destacar que los valores para el escualeno son excesivamente elevados, en torno a 40 ( $\mu\text{M}$ ) y que en global presentan gran disparidad, entre los propios estudios de estos compuestos. El grupo de Química Organometálica Aplicada que nos ha suministrado los compuestos, nos indican que la causa puede ser la estabilidad de estos complejos en las condiciones ensayadas.



| Tabla.1- Valores obtenidos del IC <sub>50</sub> (μM) |         |                |               |              |                |
|--|---------|----------------|---------------|--------------|----------------|
| Experimento  |         | A-1            | A-2           | A-3          | Escualeno      |
| 1  | Placa 1 | 4'824 ±0'356   | 4'124 ±0'336  | 3'280 ±0'331 | ----           |
|  | Placa 2 | 6'813 ±0'417   | 9'389 ±0'333  | 4'160 ±0'47  | 34'5144 ±0'186 |
|  | Media   | 5'818 ±0'387   | 6'757 ±0'335  | 3'72 ±0'400  |                |
| 2  | Placa 1 | 3,037 ±0'368   | 1,450 ±0'388  | 2,421 ±0'449 | ----           |
|  | Placa 2 | 6,124 ±0'366   | 5,884 ±0'322  | 6,492 ±0'414 | ----           |
|  | Media   | 4'580 ±0'367   | 3'667 ±0'355  | 4'457 ±0'432 |                |
| 3  | Placa 1 | 8,776 ±0'195   | 7,532 ±0'2418 | ---          | ----           |
|  | Placa 2 | 3,282 ±0'493   | 5,237 ±0'346  | 5,000 ±0'371 | ----           |
|  | Media   | 6'029 ±0'688   | 6'384 ±0'294  | ---          |                |
| 4  | Placa 1 | 7'071 ±0'174   | 5'888 ±0'179  | ---          | 48'7528 ±0'189 |
|  | Placa 2 | 9'754 ±0'167   | 7'418 ±0'161  | 6'414 ±0'169 | 41'6809 ±0'173 |
|  | Media   | 8'4125 ±0'1705 | 6'653 ±0'17   | ---          | 45'216 ±0'181  |

Si hacemos una comparativa con los valores del IC<sub>50</sub> de los compuestos que denominamos referencias, (ver tabla.2), podemos comprobar que en todos los casos estudiados para los complejos de oro(III), obtenemos unos valores mucho mejores que para el cis-platino, aunque peores que el Auranofin. En el caso del escualeno vemos que los valores obtenidos son muy similares al del cis-platino.

| TABLA.2<br>Valores obtenidos del IC <sub>50</sub> (μM), PD7 |             |
|---|-------------|
| Cis platino   | 37.24 ±5.15 |
| Auranofin   | 1.8±0.1     |

Por estas razones consideramos que el escualeno por sí solo no puede actuar como agente terapéutico anticancerígeno. El reto de compuestos, al igual que los complejos de oro(III) estudiados por otros grupos de investigación, es el complejo A-2, el que da los mejores resultados, dado que los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos son más homogéneos entre sí. Este hecho podría deberse a la coordinación ortometalada del ligando p-tolil pirina al átomo de oro(III). Esta coordinación le da una mayor estabilidad al átomo de oro, y así es mucho más difícil que Au(III) se oxide en el medio fisiológico.

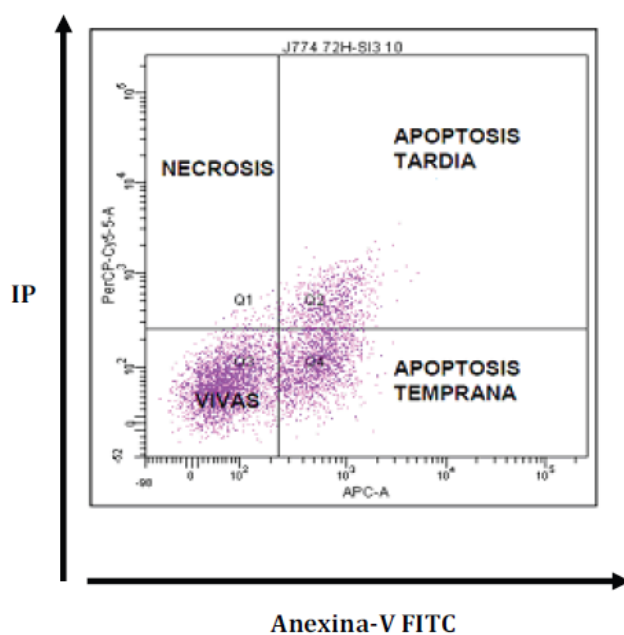
#### **4.2. ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS: APOPTOSIS Y CICLO CELULAR.**

Los experimentos de toxicidad “in vitro” de Apoptosis y Ciclo Celular mediante la técnica de citometría de flujo (CMF), se realizaron en el Centro de Investigación Biológica de Aragón. (CIBA)

##### ***Estudios de apoptosis celular:***

Para el estudio de citometría de flujo se eligió el compuesto A2, ya que los valores de IC<sub>50</sub> obtenidos eran los más óptimos de los complejos estudiados. Se han realizado dos estudios independientes para el complejo A2, para el Escualeno y para la mezcla de ambos.

Se emplea la técnica de exclusión del ioduro de propidio (IP) por células vivas. Las células vivas no tienen ninguna afinidad por estos marcadores, a diferencia de las células muertas, que incorporan colorante entre las bases del ADN y del ARN y mediante esta unión la fluorescencia del ioduro del IP se incrementa.

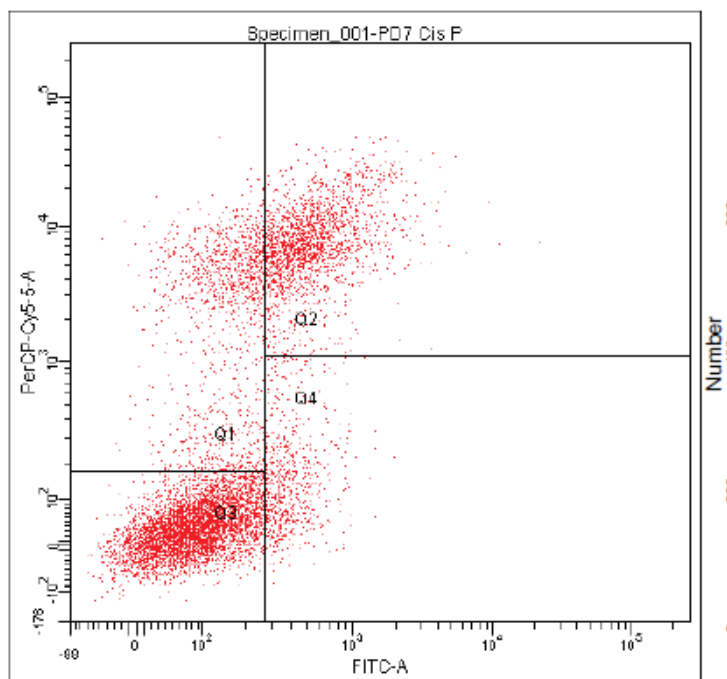


**FIGURA. Histograma Anexina-V/IP**

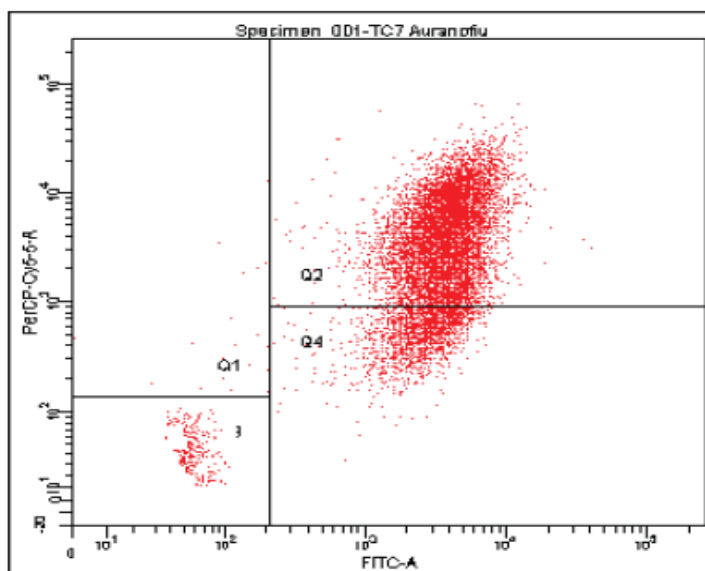
De esta manera se pueden calcular los porcentajes de células vivas y de células muertas, y determinar si la muerte celular se produce mediante procesos de apoptosis o necrosis. En general y como se ha comentado previamente en la introducción, las células cancerígenas presentan un crecimiento descontrolado. Mediante estos estudios podemos ver si los compuestos estudiados, o la mezcla de ellos favorecen una muerte programada. Siendo el resultado óptimo una apoptosis tardía.

A continuación se muestran los histogramas de referencia del cis-platino y del auranofin, que más adelante comparamos con nuestros “fármacos” estudiados.

a) Cis-Platino:



b) Auranofin:

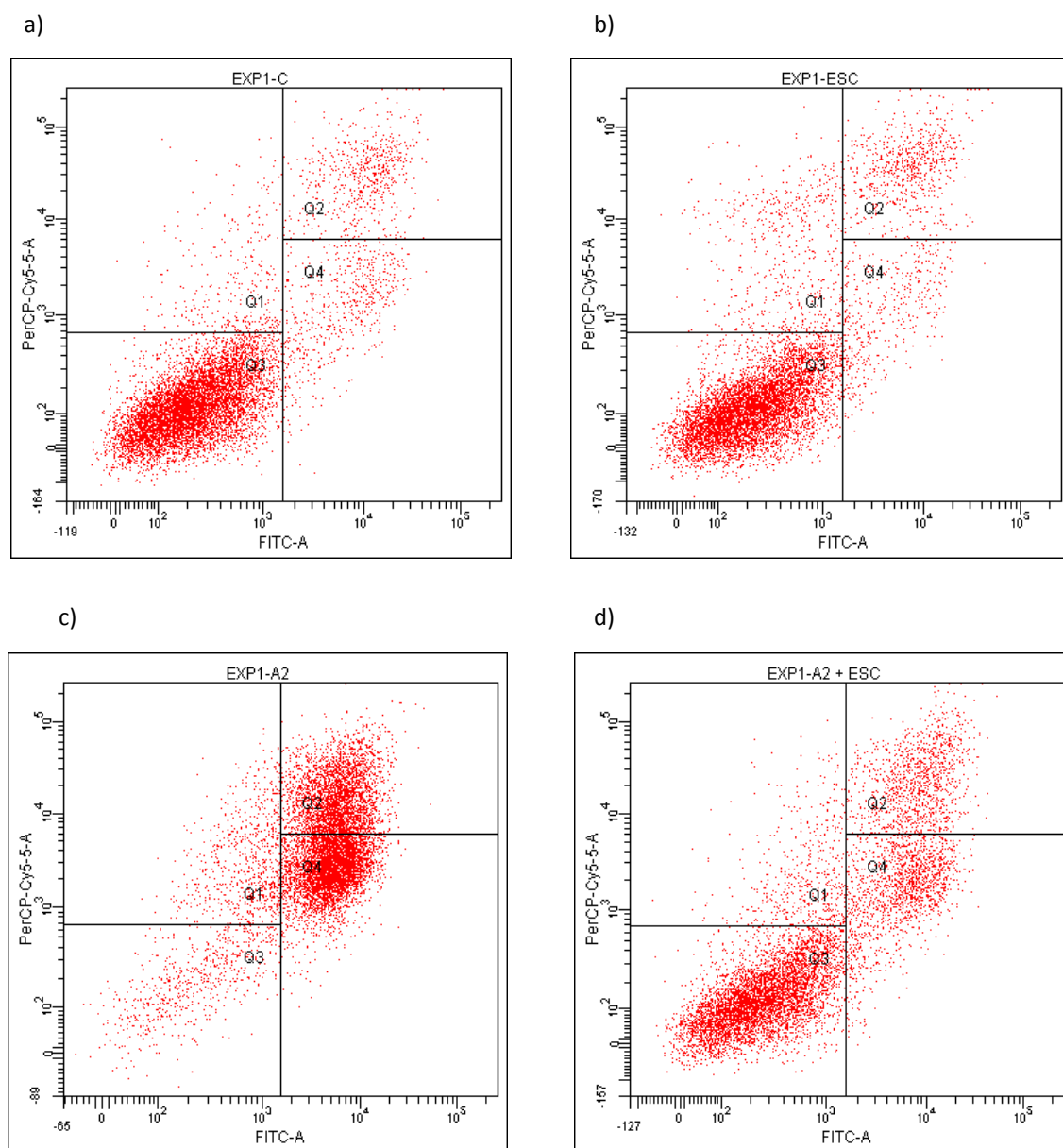


Histogramas de referencia a) cis-platino, b) Auranofin , para clones PD7.

A continuación se muestra un resumen de los histogramas obtenidos mediante análisis cualitativo, utilizando citometría de flujo tanto para el estudio del Escualeno, como para el estudio del complejo organometálico A2, y para la mezcla de ambos

compuestos en células de Caco-2. En todos los casos se representa la interacción con la anexina V y la interacción con el Ioduro de propidio, eje de abcisas y eje de ordenadas respectivamente. También se exponen en las tablas 3 y 4 los porcentajes de supervivencia celular obtenidos mediante esta técnica.

### Histogramas 1º estudio comparativo:



Histogramas 1º estudio : a) Control. b) Escualeno, c) complejo A2, d) escualeno + A2

**Tabla.3**

| ESTUDIO 1     |        |           |                   |                     |
|---------------|--------|-----------|-------------------|---------------------|
| COMPUESTO     | %Vivas | %muertas  |                   |                     |
|               |        | %Necrosis | %Apoptosis tardía | %Apoptosis temprana |
|               | Q3     | Q1        | Q2                | Q4                  |
| Control       | 83.7   | 3.6       | 6.4               | 6.3                 |
| A2            | 6.8    | 7.8       | 34.7              | 50.7                |
| Escualeno     | 79.4   | 6.7       | 8.4               | 5.4                 |
| A2 +Escualeno | 64.3   | 5.8       | 12.9              | 17.0                |

Los resultados muestran como el porcentaje de células vivas tras el tratamiento con el escualeno es muy parecido al porcentaje de células vivas del histograma control, lo que nos lleva a pensar que el Escualeno si es un buen producto como alimento de las células, el inconveniente es que resulta muy beneficioso para todos tipo de células, ya sean o no cancerígenas. También se puede resaltar que los valores obtenidos para apoptosis tardía son ligeramente superiores a los encontrados en el histograma control. El Escualeno modifica el comportamiento de estas células, pero el solo no tiene carácter anticancerígeno.

De los resultados obtenidos para el complejo A2 vemos que la apoptosis temprana es el resultado más significativo, en segundo lugar está la apoptosis tardía, y en ambos estudios determinamos que el porcentaje de células vivas tras el tratamiento con el derivado A2 ronda el 7 %. Este es un resultado esperanzador, ya que por sí solo este fármaco puede inducir a una muerte programada de las células.

El tratamiento conjunto de Escualeno y A2 no mejora los resultados del complejo organometálico sino que por el contrario lo reduce. Esto probablemente se deba a el carácter benefactor que el escualeno tiene sobre todo tipo de células, ayudándolas en su crecimiento.

En todos los estudios, los porcentajes de necrosis siempre son menores del 10%, y en el caso del A-2 los porcentajes obtenidos tanto para la apoptosis temprana o para la apoptosis tardía son elevados. Esto es un resultado muy positivo ya que los fármacos diseñados para los tratamientos de quimioterapia buscan preferentemente una muerte celular por apoptosis.

Si realizamos una comparativa con los productos de referencia, cis-platino y auranofin, “a groso modo” se podría decir que el comportamiento del complejo A2 es más parecido al Auranofin, que al del cis-platino. Los valores encontrados para el complejo de oro(III) son más prometedores que los valores estándar del cis-platino. Esto es un resultado esperanzador, ya que uno de los objetivos de este tipo de investigaciones es mejorar el efecto del cis-platino.

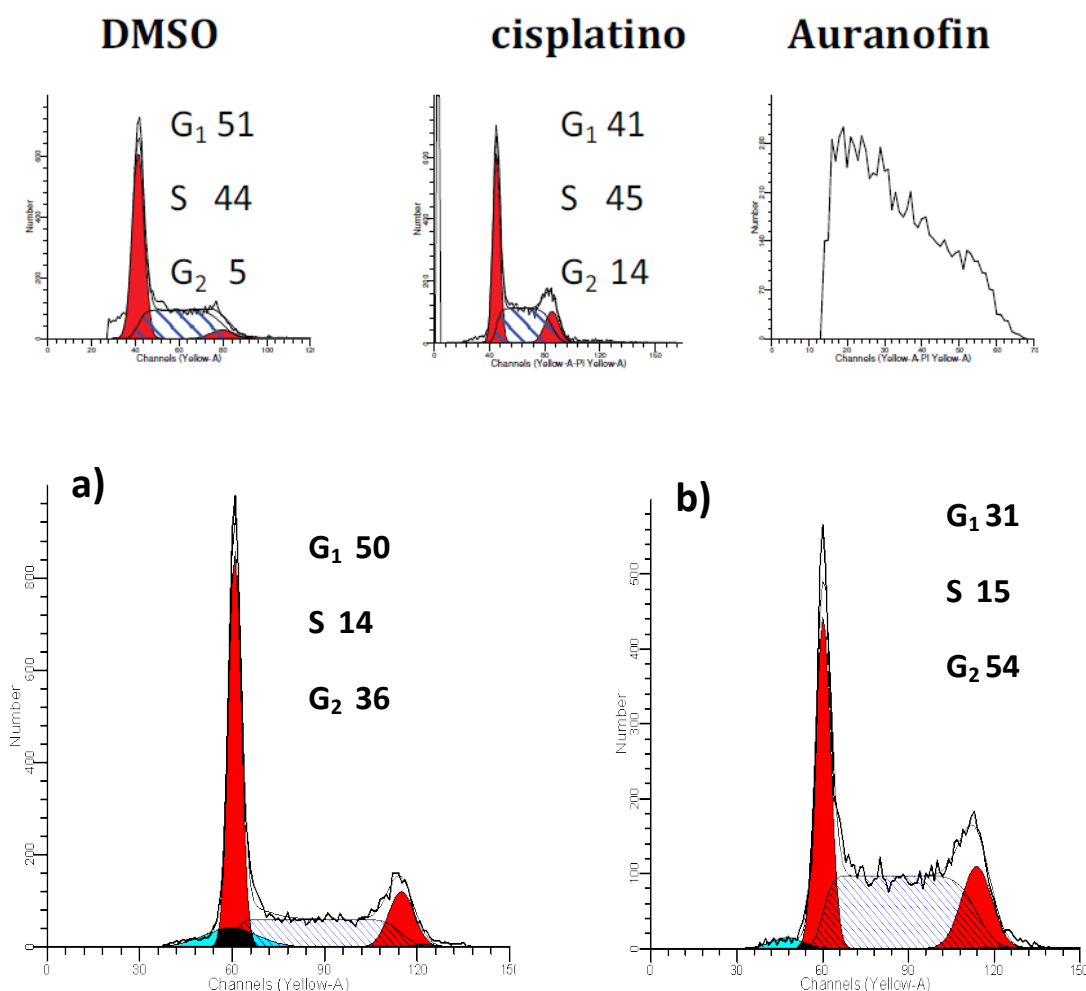
### ***Estudios de ciclo celular***

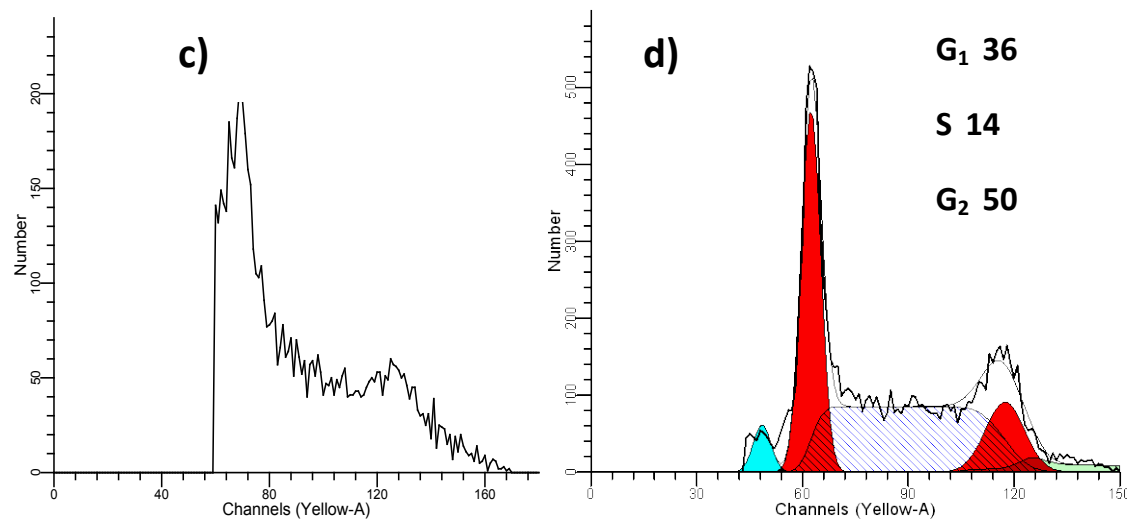
Se han realizado ensayos del ciclo celular para el compuesto A-2, para el escualeno y para la mezcla de ambos. Estos estudios son una premisa para poder valorar si se encuentra afectada alguna fase del ciclo celular.

Con estos estudios nos se puede asegurar que exista una interacción de los fármacos estudiados con el DNA celular, en el caso de que exista interacción aparecería competencia directa con el yoduro de propidio, por tanto podemos hacer una estimación de los resultados a falta de los estudios posteriores de interacción da ácidos nucleídos, como estudios de electroforesis

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes grafica, como referencia

#### **Resultados para el estudio nº1)**





Graficas: a) Control. b) Escualeno, c) complejo A2, d) escualeno + A2.

Tanto para el escualeno, como para la mezcla de escualeno con el complejo A-2 observamos un aumento de la población en la fase S y en G<sub>2</sub>, posiblemente se deba a la disminución de la población G<sub>1</sub>. Estos resultados son similares a los observados en los histogramas del cis-platino en esta misma línea celular. Para el compuesto A-2, el histograma obtenido es más similar al del Auranofin.

# CONCLUSIONES



## **5-CONCLUSIONES**

---

En este trabajo fin de máster he podido adquirir los conocimientos básicos para desarrollar las habilidades en las técnicas más utilizadas en la investigación aplicada en estudios biomoleculares en relación a estudios farmacológicos y estudios de ciclo celular.

Hemos podido determinar que los compuestos A-1, A-2 y A-3 empleados no tienen unos valores del IC<sub>50</sub> óptimos, pero en todos los casos son mucho mejores que los del cis-platino.

El compuesto A-2 nos dió los resultados de IC<sub>50</sub> más homogéneos y aceptables para los estudios de citometría de flujo y ciclo celular.

Se ha comprobado que los resultados de muerte celular por necrosis son siempre inferiores al 10%, lo que indica que el fármaco A2, puede provocar una muerte celular programada. Los resultados obtenidos nos indican que la muerte por apoptosis tardía es más significativa que la muerte por apoptosis temprana.

Por los resultados obtenidos, no podemos indicar que el escualeno tenga un efecto anticancerígeno. Por el contrario si que parece interactuar con el complejo A-2 reduciendo su efecto apoptótico lo que nos confirmaría el efecto antioxidante de escualeno.

# **BIBLIOGRAFIA**

## **6-BIBLIOGRAFÍA.**

---

- Diccionario terminológico de ciencias medicas, 12ª edición , Salvat,279(1990)
- Bhattacharya, R. & Mukherjee, P. (2008). Advanced Drug Delivey Reviews.60: 1289-1306.
- Chen, P.C., Mwakwari, S.C. & Oyelere, A.K. (2008). Nanotechnology, Science and Applications.I: 45-66.
- ROTH, B. J. et al., 2013. Journal of Clinical Oncology, 31(1): 131-161.
- Instituto nacional del cáncer, 24-sep-2010
- Rosenberg SA (Jan 1984). Cancer Treat Rep 68 (12): 233–55
- Fogh J (J. Fogh, ed.), Plenum, 1975, 115-141
- P. Artursson and J. Karlsson. *Biophys. Res. Commun.*, 175, 880 (1991).
- H. Lennernas, *J. Pharm. Sci.*, 87, 403 (1998)
- G. Trapani, M. Franco, A. Trapani, A. Lopedota, A. Latrofa, E. Gallucci, S. Micelli, G. Liso, *J. Pharm. Sci.*, 93, 2909 (2004)
- Y. Tanaka, Y. Taki, Y. Sakane, T. Nadai, H. Sezaki and S. Yamashita, , *Pharm. Res.*, 12, 523 (1995).
- H. Lennernas, K. Palm, U. Fagerholm and P. Artursson, *Int. J. Pharm.*, 127, 103 (1996).
- J.E. Polli and M.J. Ginski, *Pharm. Res.*, 15, 47 (1995)
- P. Artursson, K. Palm and K. Luthman, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 46, 27 (2001).
- I.J. Hidalgo, T.J. Raub and R.T. Borchardt, *Gastroenterology*, 96, 736 (1989)
- K.L. Audus, R.L. Bartel, I.J. Hidalgo and R.T Borchardt, *Pharm. Res.*, 7, 435 (1990)
- S. Yamashita, Y. Tanaka, Y. Endoh, Y. Taki, T. Sakane, T. Nadai, H. Sezaki, *Pharm. Research*, 14, 486 (1997)
- P. Artursson, *Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 8, 305 (1991).
- U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration  
Guidance for Industry. CDER-FDA. Rockville MD, USA 2000, pp. 1-16
- Antti saraste.Herz 1999 mayo;24(3)189-95
- Rodriguez Lourdes y Reyes EsperanzaJorge Alberto.Elfo Scientiae 1995
- Ernesto Alfaro Moreno,\* Claudia García Cuéllar,\* Alfonso Dueñas González. *Rev Inst m.* 4 Octubre-Diciembre 2000 pp 275-28

- Mark M. Comton.Cancer and Metastasis Reviews. Vol 11 Issu2,pp105-119
- Peitsch MC, Mannherz HT y Tschoop J (1994).Trends Cell Biol 4:37-41
- Elmore S. Toxicol pathol. 2007, Jun35(4):495-516
- Mark M. Comton.Cancer and Metastasis Reviews. Vol 11 Issu2,pp105-119
- TaKemura G. Kato S.,Aoyama T, Hayakawa Y, Kanoh M, Mauruya R, Arai M, Nishigaki K, Minatoguchi. J Pathol. 2001.Apr:193(4):546-56
- J.D. Ly, D. R. Grubb. A.Lawen. Apoptosis ,March 2003, vol 8,Issue2.pp115-128
- Cohen,JJ. And Duke R.Ç.(1984)J.Immunol.132:38-42
- Raff MC(1992) Nature 356:397-400
- Duke RC, Ojcius Dm y Young DE(1996)Annu Rev. SciAmer 52:48-55
- Majno G, Joris I. Am J Pathol 1995;146:3-15.
- Nobel Lectures, *Chemistry 1922-1941*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1966.
- Newmark HL.. Ann New York Acad Sci 1999; 889:193-203
- Lowy DR, Willumsen BM. Annu Rev Biochem 1993; 62:851-891
- Milburn MV, Tong L, DeVos AM et al. Ciencia 1990; 247:939-945.
- Gregory S. Kelly, N.D.. Altern Med Rev 1999;4(1):29-36.
- Ara G, Kusumoto T, Korbut TT, Cullere-Luengo F, Teicher BA.Cancer resv. 1994. Mar 15, 6, (1497-502)
- Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. (1965). *Nature* 205 (4972): 698–9
- Rebecca A. Alderden, Matthew D. Hall, and Trevor W. Hambley (2006). *J. Chem. Ed.* 83: pp. 728–724.
- Dhara, S. C. (1970). 8: pp. 193–134.
- M.C. Gimeno, M. Laguna: Anuales R.S.E.Q.Abril-Julio(2000)
- Daniela Saggioro , Lucia Paloschi, Alessandra Folda, Stephen A. Moggach, Simon Parsons, Luca Ronconi, Dolores Fregona\* and Alberto Bindoli\*.Chemistry & Biology 14, 1128–1139, October 2007
- Parish, R.V. R.V. Parish. Interdiscipl. Sci. Rev.,(1992).17. 3.pp 221.228.

Daniela Saggioro , Lucia Paloschi, Alessandra Folda, Stephen A. Moggach, Simon Parsons, Luca Ronconi, Dolores Fregona\* and Alberto Bindoli\*. Chemistry & Biology 14, 1128–1139, October 2007

A. Casini et coll. Journal of Inorganic Biochemistry 102 (2008) 564–575

# **ANEXOS**

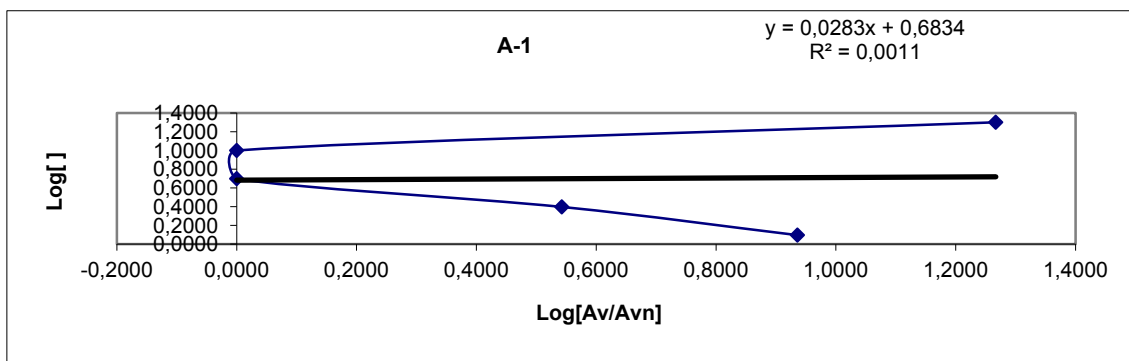
## 7-ANEXOS

### 7.1-Gráficas obtenidas del cálculo del IC<sub>50</sub>

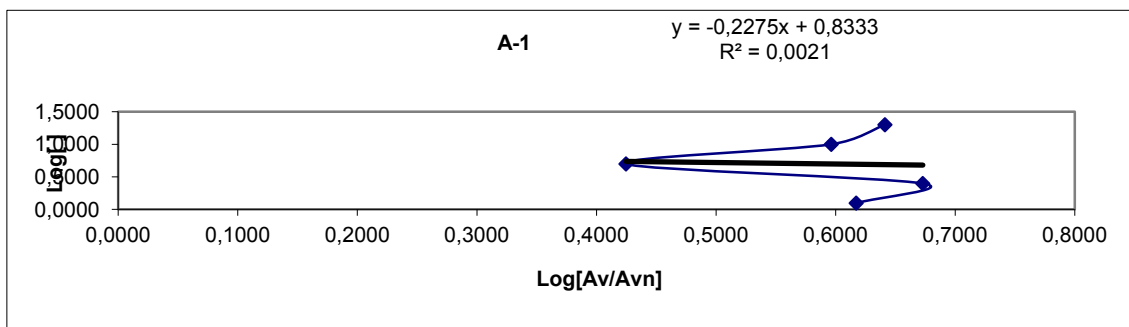
#### EXPERIMENTO 1 (72h)

##### Complejo: A-1

Placa 1:

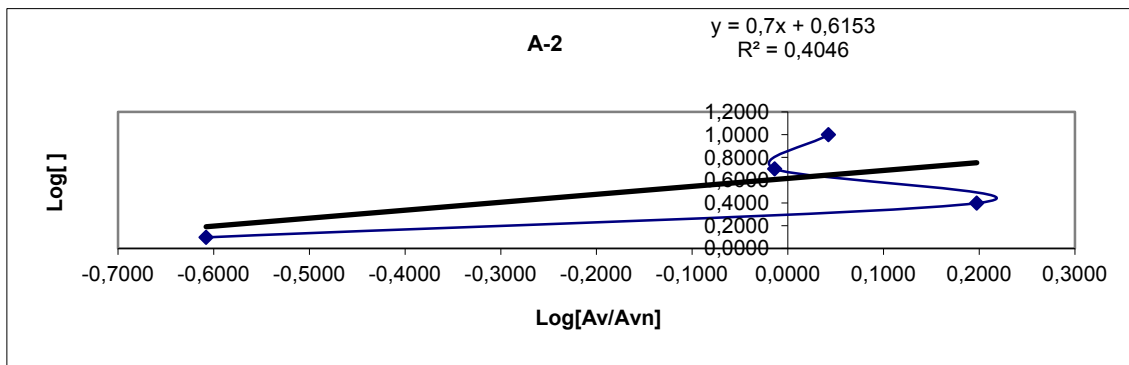


Placa 2:

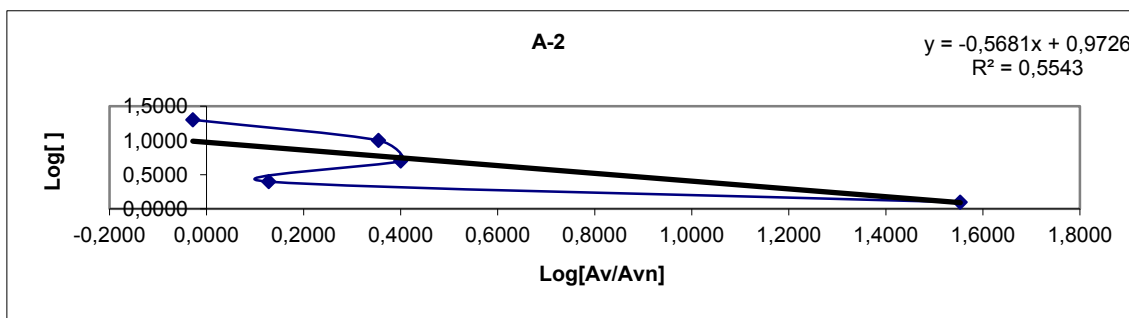


##### Complejo A-2

Placa1:

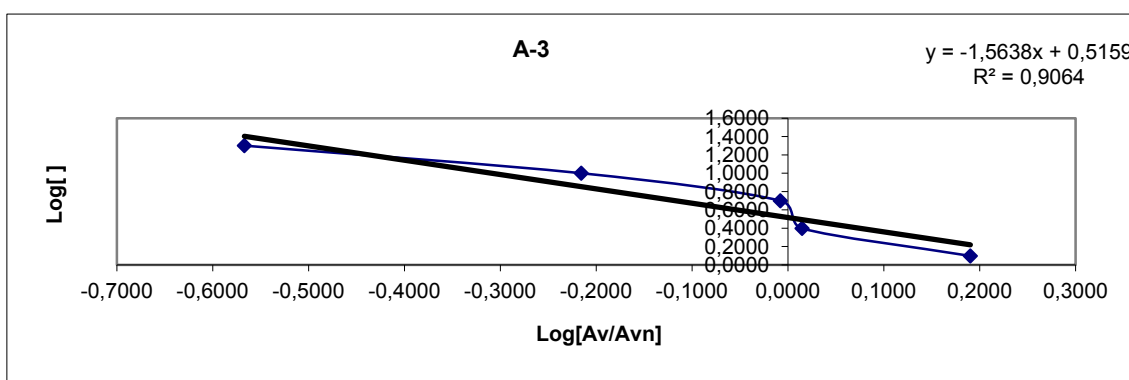


Placa2:

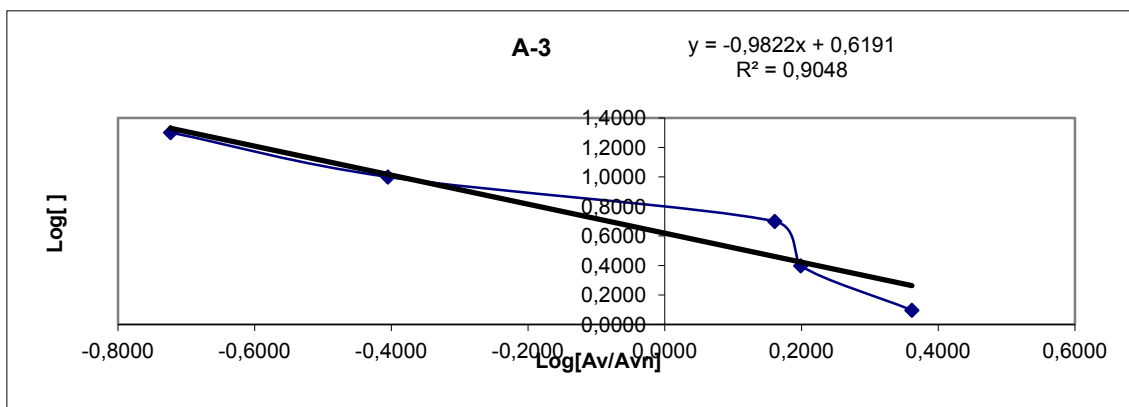


Complejo A-3

Placa 1:



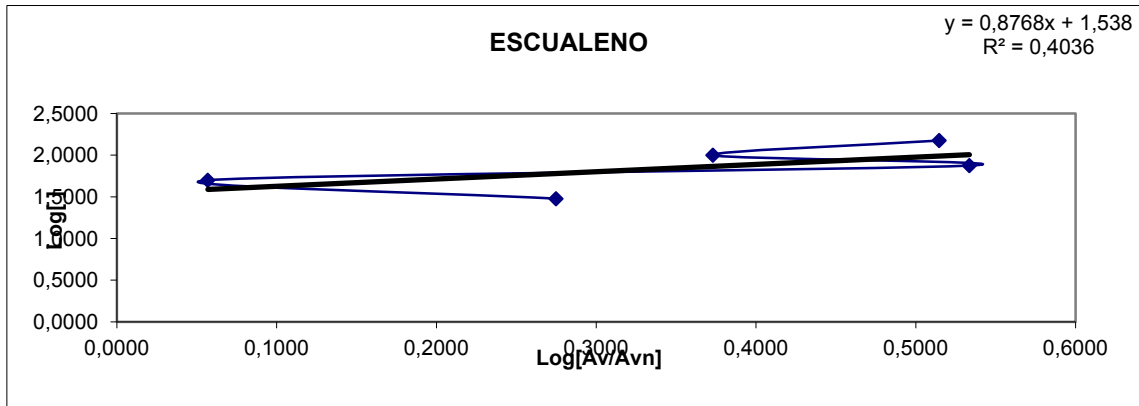
Placa 2:





## Escualeno

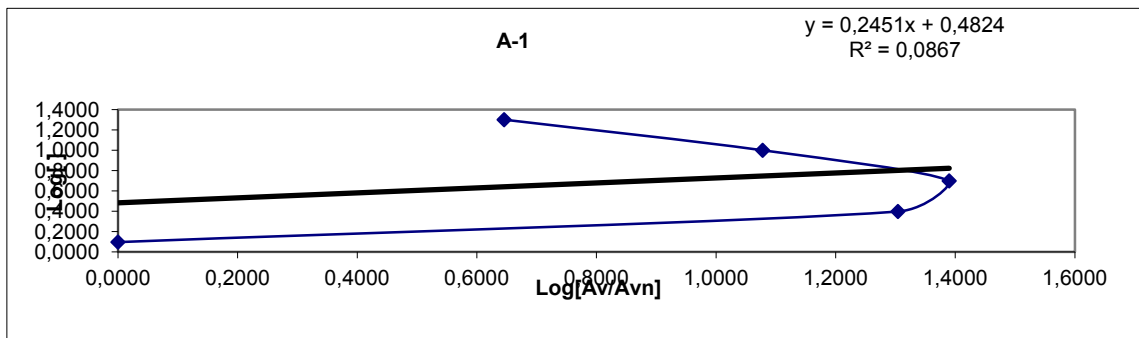
Placa 2:



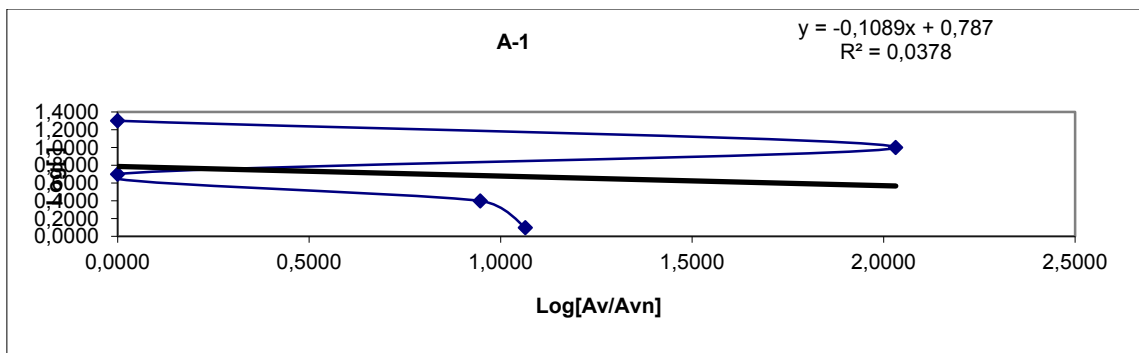
## EXPERIMENTO 2 (72h)

A-1

Placa 1:

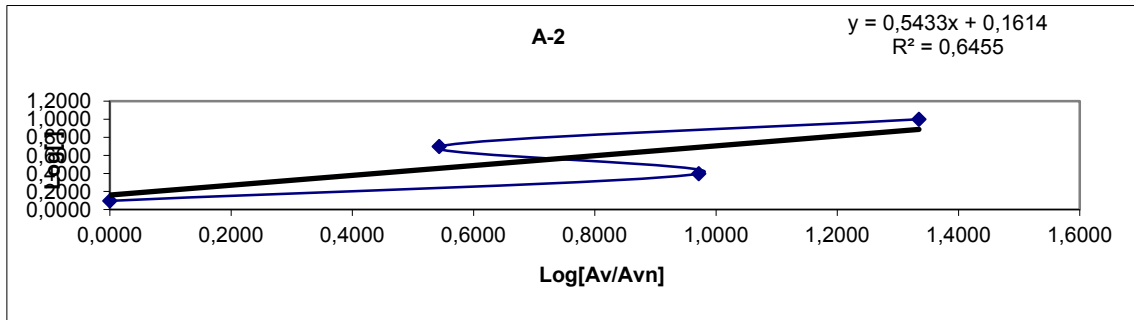


Placa 2:

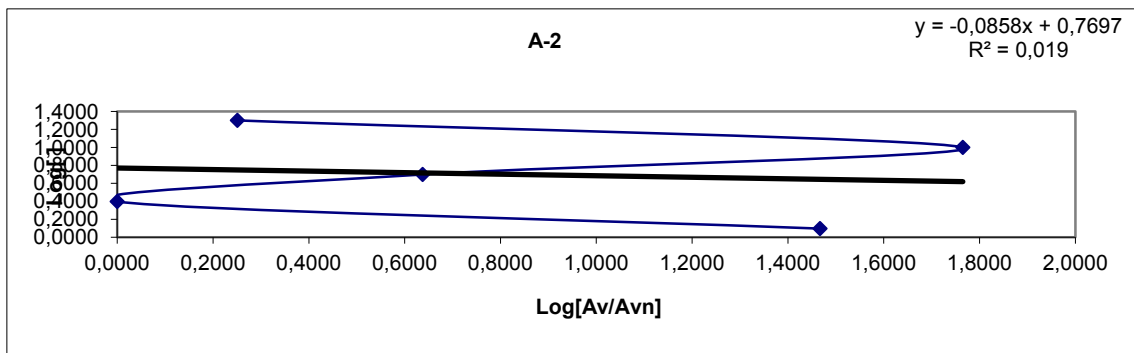


## A-2

### Placa 1

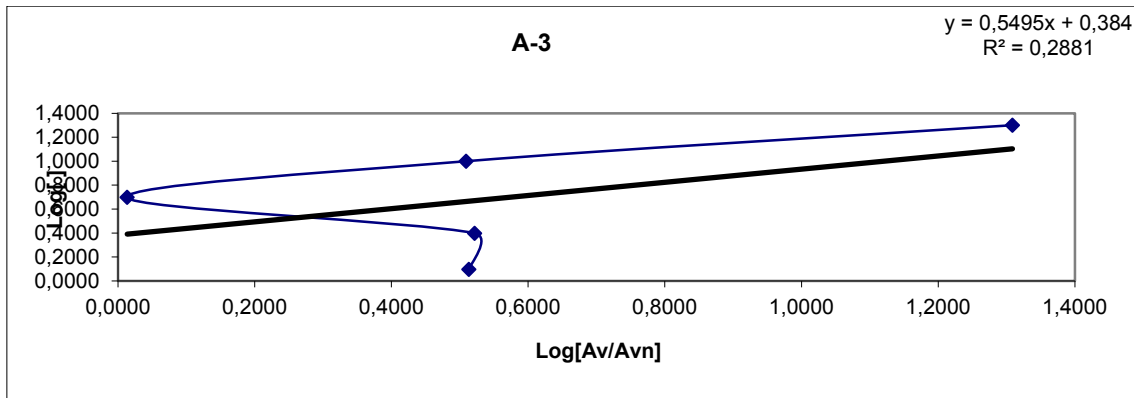


### Placa 2:

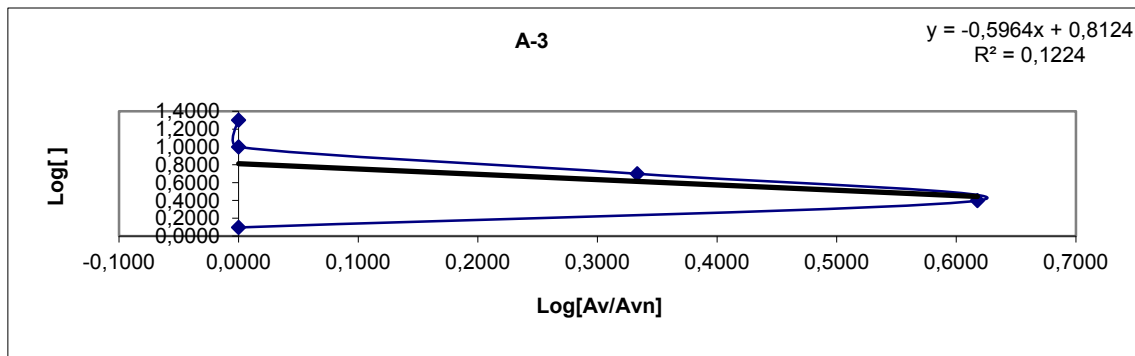


## A-3

### Placa 1:



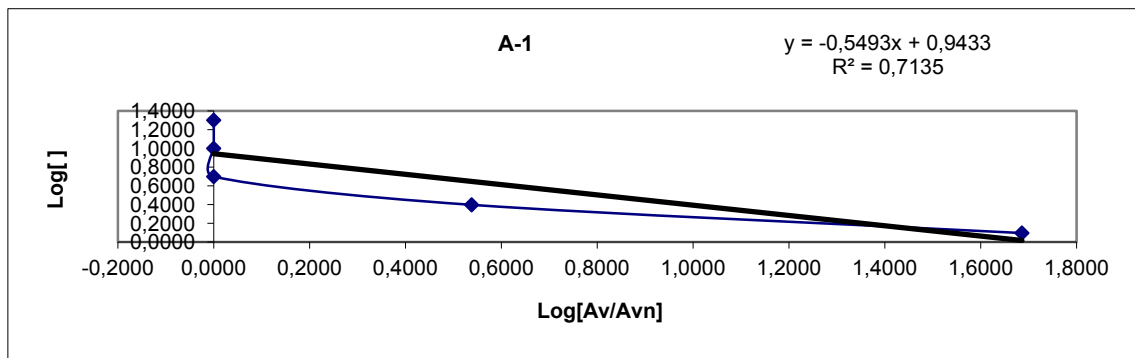
### Placa 2:



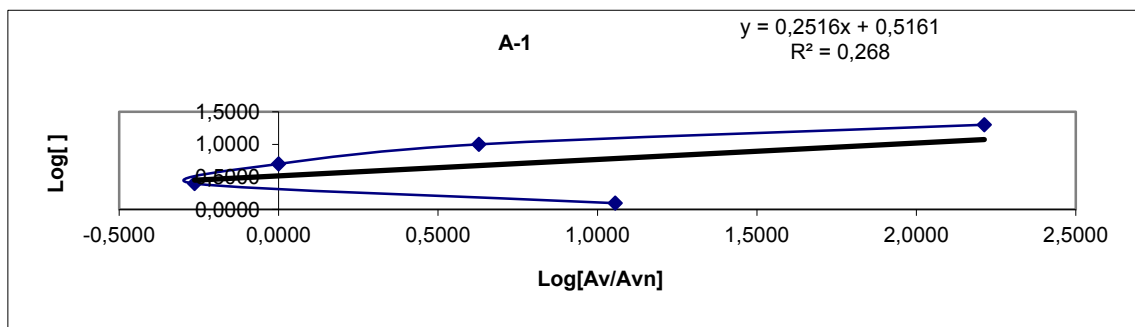
### EXPERIMENTO 3 (72h)

#### A-1

Placa 1:

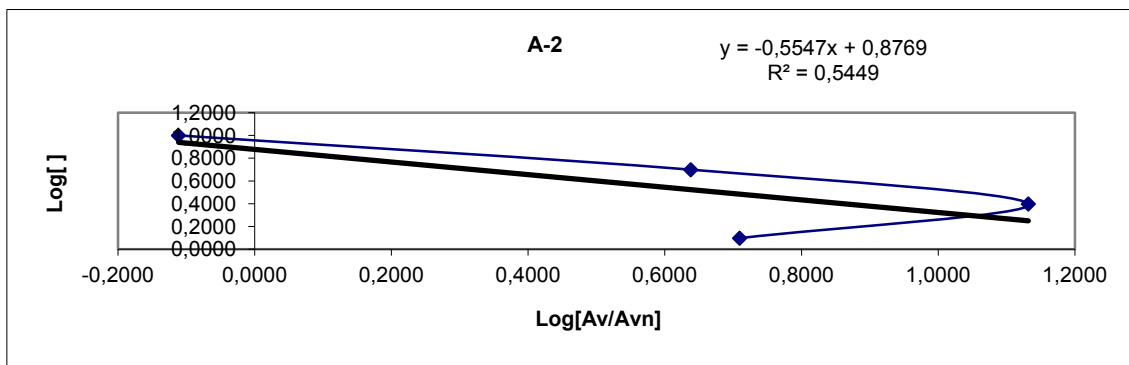


Placa 2:

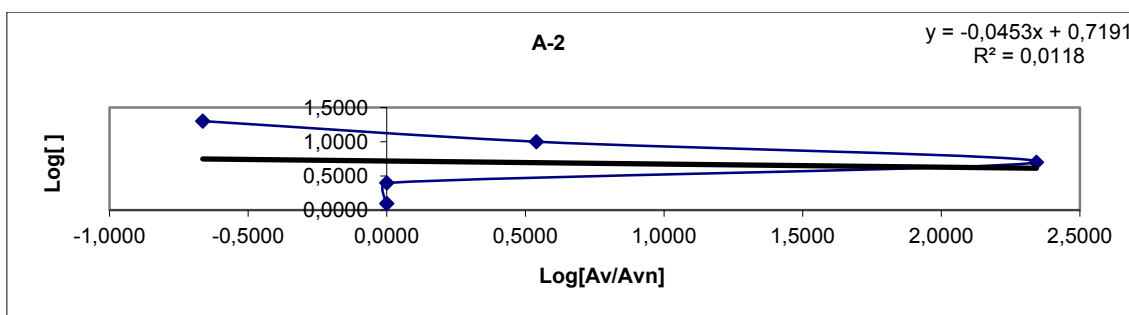


## A-2

Placa 1:

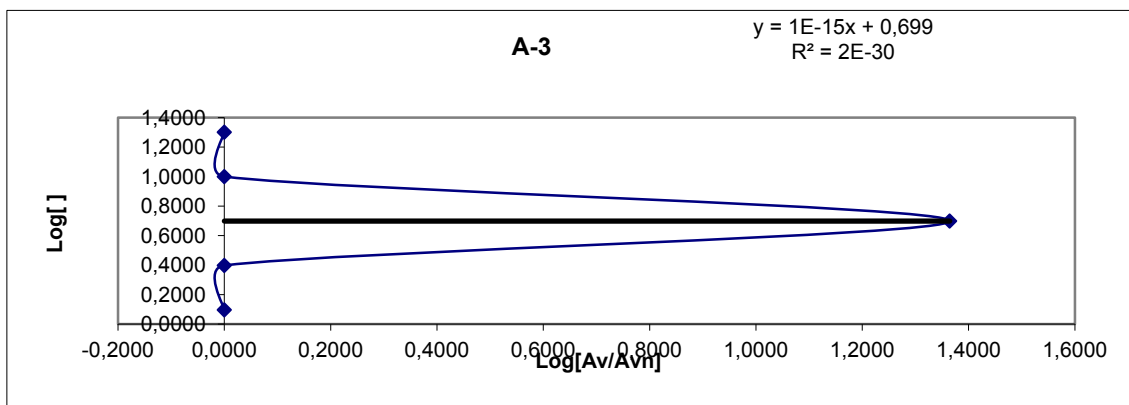


Placa 2:



## A-3

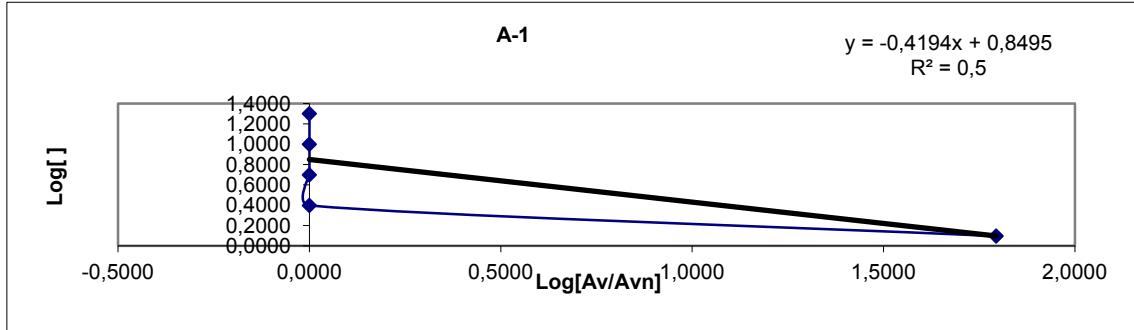
Placa 2:



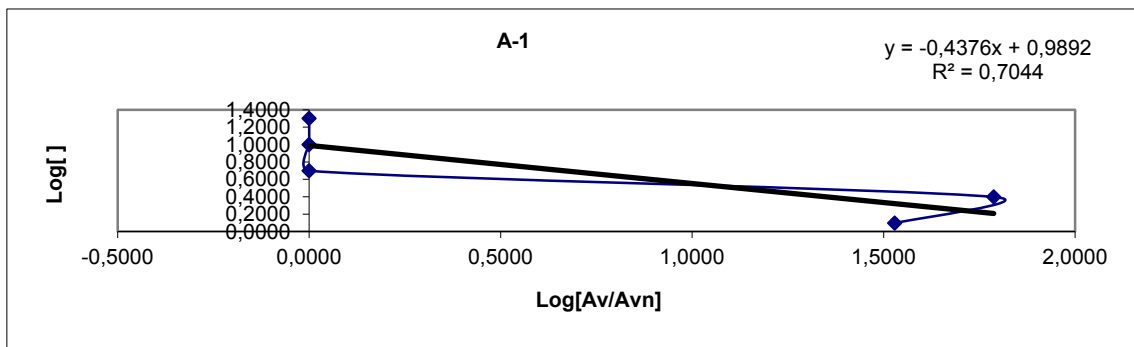
## EXPERIMENTO 4 (24h)

### A-1

Placa 1:

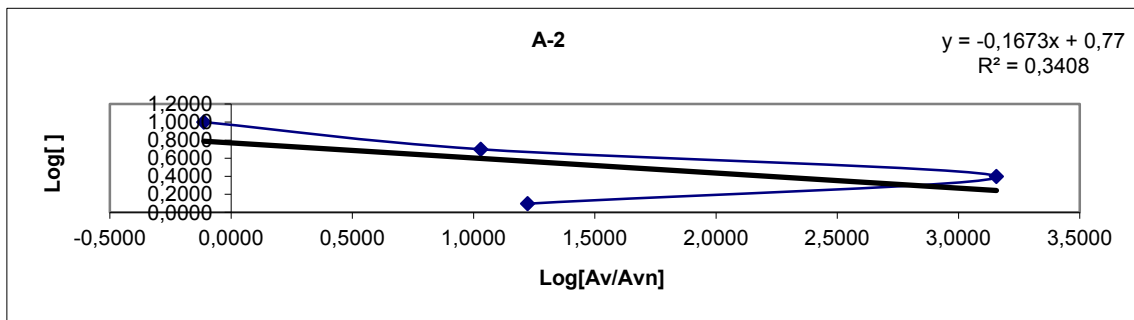


Placa 2:

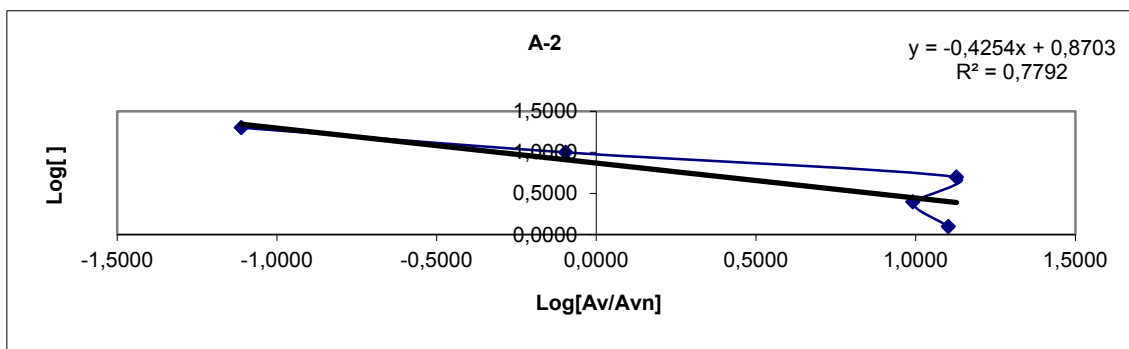


### A-2

Placa 1:

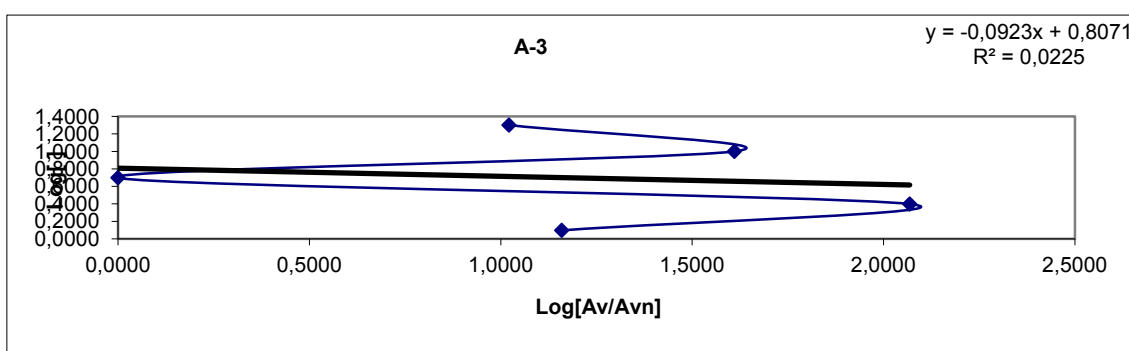


Placa 2:



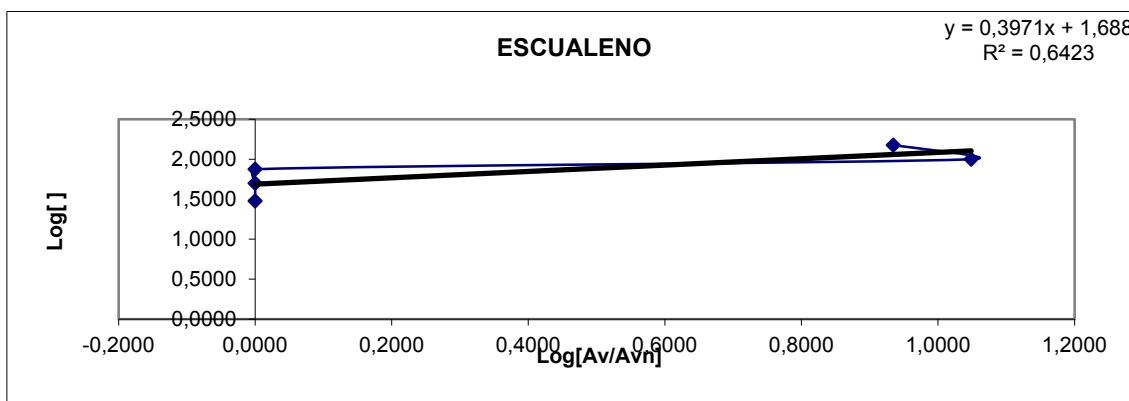
**A-3**

Placa 2:

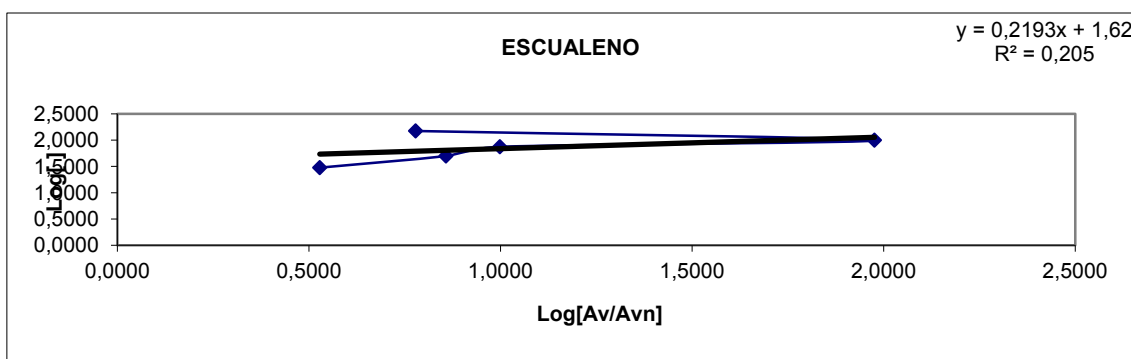


**ESCUALENO**

Placa 1:



Placa 2:



## 6.2- Caracterización de complejos de Oro(III):

A continuación se muestran los datos obtenidos por técnicas espectroscópicas para la caracterización de los complejos de Oro(III) empleados en los estudios farmacodinámicos. Estos datos han sido facilitados el grupo de Química Organometálica Aplicada, (CSIC-ISQCH), de la Universidad de Zaragoza.

### ORO:1 [AuCl<sub>3</sub>(p-tolilpiridina)]:

Sólido amarillo. (PM=470.96)

**Análisis elemental:** C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>AuCl<sub>3</sub>N; PM=470.96

Teórico: % C: 30.50; H: 2.35; N: 2.96

Experimental: % C: 30.64, H: 2.44; N 3.21

**IR:**  $\nu_{(CH)}$  3047 y 768,  $\nu_{(C=N)}$  1477,  $\nu_{(AuCl)}$  359 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H -NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$ = 8.77 (d, 1H, J=5.5Hz, H<sub>1</sub>), 8.14 (td, 1H, J=1.1Hz, J=7.8Hz, H<sub>3</sub>), 7.78 (dd, 1H, J=0.8Hz, J=8.0Hz, H<sub>4</sub>), 7.73 (d, 2H, J=8.1Hz, H<sub>7,8</sub>), 7.66 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 7.42 (d, 2H, J=7.9Hz, H<sub>9,10</sub>), 2.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H}-NMR:**  $\delta$  = 149.81, 142.08, 141.77, 134.35, 130.40, 129.43, 128.83, 125.79, 21.66, ppm.

**MALDI<sup>-</sup>:** 338.8 (8.5%) [Au<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, 498.8 (100%) [Au<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, 732.8 (30%) [Au<sub>3</sub>Cl<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 964.9 (5.5%) [Au<sub>4</sub>Cl<sub>5</sub>]<sup>-</sup>. **MALDI<sup>+</sup>:** 535.4 (49%) [AuL<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 569.4 (20%) [Au<sub>2</sub>L<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup>, 605.4 (11%) [Au<sub>2</sub>L<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, 767.5 (2%) [Au<sub>3</sub>Cl<sub>5</sub>]<sup>+</sup>, 801.5 (2%) [Au<sub>3</sub>Cl<sub>6</sub>]<sup>+</sup>.

**ORO:2 [AuCl<sub>2</sub>(p-tolilpiridina)]:**

Solido amarillo claro, (PM: 436.09 g/mol).

Condiciones de síntesis:

MeCN/H<sub>2</sub>O: 1:1 HNaCO<sub>3</sub>: 1.1mmol; 0.0924g.

Tiempo de reacción: 6h. Temperatura de reflujo.

**Análisis elemental:** C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>AuCl<sub>2</sub>N. PM = 436,09

Teórico: % C: 33.05; H: 2.31; N: 3.21

Experimental: % C: 32.81, H: 2.16; N 2.92

**IR:**  $\nu_{(\text{CH})}$  3075, 3039, 2982 y 771,  $\nu_{(\text{C}=\text{C})}$  1605 y 1593,  $\nu_{(\text{C}=\text{N})}$  1434,  $\nu_{(\text{AuCl})}$  355 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H -NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):**  $\delta$  =9.79 (dq,  $J$ =6.1, 1.5, 0.5 Hz, 1H,  $H_1$ ), 8.10 (td,  $J$ =8.1, 7.5, 1.5 Hz, 1H,  $H_4$ ), 7.87 (dd,  $J$ =17.8, 7.2 Hz, 2H,  $H_{7,8}$ ), 7.48 – 7.41 (m, 2H,  $H_{2,3}$ ), 7.20 (dq,  $J$ =7.9, 1.5, 0.7 Hz, 1H,  $H_{10}$ ), 2.45 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ) ppm

**MALDI<sup>-</sup>:** 498.9 (100%) [Au<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, 732.9 (38%) [Au<sub>3</sub>Cl<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 964.9 (6%) [Au<sub>4</sub>Cl<sub>5</sub>]<sup>-</sup>. **MALDI<sup>+</sup>:** 533.2 (100%) [AuL<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

**ORO 3 : [AuCl<sub>2</sub>(2-acetilpiridina)] (17):**

Solido rosa (PM: 388.00 g/mol).

Condiciones de síntesis:

MeCN/H<sub>2</sub>O: 3:5. Tiempo de reacción: 3h

**Análisis elemental:** C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>AuCl<sub>2</sub>N; PM = 388.00

Teórico: % C: 21.67; H: 1.56; N: 3.61

Experimental: % C: 21.32, H: 1.20; N: 3.47

**IR:**  $\nu_{(\text{CH})}$  3099,3027, 779 y 767,  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$  1740,  $\nu_{(\text{C}=\text{N})}$  1604,  $\nu_{(\text{AuCl})}$  356 y 312 cm<sup>-1</sup>.

**<sup>1</sup>H -NMR (400 MHz, DMSO):**  $\delta$  =9.63 (ddd,  $J$ =5.8, 1.4, 0.6 Hz, 1H,  $H_1$ ), 8.55 (td,  $J$ =7.7, 1.4 Hz, 1H,  $H_3$ ), 8.17 (ddd,  $J$ =7.6, 5.8, 1.7 Hz, 1H,  $H_4$ ), 8.09 (ddd,  $J$ =7.7, 1.6, 0.6 Hz, 1H,  $H_2$ ), 3.72 (s, 2H,  $H_7$ ) ppm.

**MALDI<sup>-</sup>:** 266.7 (70%) [AuCl<sub>2</sub>]<sup>-</sup>, 498.9 (100%) [Au<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, 732.8 (45%) [Au<sub>3</sub>Cl<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, 964.4 (7%) [Au<sub>4</sub>Cl<sub>5</sub>]<sup>-</sup>. **MALDI<sup>+</sup>:** 426.9 (100%) [AuL<sub>2</sub>-C]<sup>+</sup>.



